

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年8月5日 (05.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/065418 A1(51) 国際特許分類⁷: C07K 16/18, C12N 15/13,
C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 7/02[JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井153番
地2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000429

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatushi et al.); 〒
3000847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2004年1月20日 (20.01.2004)

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 國際調査報告書(30) 優先権データ:
特願2003-011529 2003年1月20日 (20.01.2003) JP2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目
5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 古賀 隆樹 (KOGA,
Takaki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目
135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 木村 直
紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡
新治村永井153番地2 中外製薬株式会社内 Ibaraki
(JP). 吉野 武 (YOSHINO, Takeshi) [JP/JP]; 〒3004101
茨城県新治郡新治村永井153番地2 中外製薬株式会社内
Ibaraki (JP). 小野 浩一郎 (ONO, Koichiro)

(54) Title: ANTI-PCI NEUTRALIZING ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗PCI中和抗体

(57) Abstract: It is intended to provide an anti-PCI antibody having a function of neutralizing protein C inhibitor (PCI) and utilization thereof. By producing and screening an anti-PCI antibody, an anti-PCI antibody inhibiting the functions of PCI of inhibiting the formation and activity of activated protein C (aPC) is successfully isolated. This antibody regulates the functions of PCI of inhibiting the formation of aPC and/or inactivating aPC, which makes it usable in maintaining the activity of aPC and sustaining the effects of the physiological activities of aPC of preventing the blood coagulation system from activation or an antiinflammatory function. It is also intended to provide utilization of the above antibody in treating thrombosis, sepsis, and so on using aPC. In a treatment with the administration of aPC, the administration of the above antibody contributes to the sustainment of the therapeutic effects. This antibody is usable in treating and preventing thrombosis, sepsis and so on.

(57) 要約: 本発明は、プロテインCインヒビター (PCI) に対して中和作用を有する抗PCI抗体およびその利用を提
供する。抗PCI抗体の製造およびスクリーニングにより、活性化プロテインC (aPC) の生成および活性を阻害する
PCIの作用を阻害する抗PCI抗体を単離することに成功した。本発明の抗体は、PCIのaPC生成阻害作用および/また
はaPC不活性化作用を抑制することを通して、aPCの活性を維持し、血液凝固系の活性化の抑制または抗炎症作用
などのaPCの生理活性の効果を持続させるために使用することができる。また本発明は、血栓症および敗血症など
のaPCによる治療における本発明の抗体の使用を提供する。aPC投与による治療において、本発明の抗体を投与す
ることにより、治療効果を持続させることができる。本発明の抗体は、血栓症および敗血症などの治療および予防
において利用される。

WO 2004/065418 A1

明細書

抗PCI中和抗体

技術分野

本発明はプロテインCインヒビター (PCI) の中和抗体に関する。

背景技術

静脈血栓症は、下肢関節置換術、あるいは開腹手術後に高頻度で発症する。現在その治療は主として低分子ヘパリンおよびワーファリンにより予防的に行われている。しかし低分子ヘパリンは連日の皮下投与が必要であり、ワーファリンは経口投与できるがタンパク結合率が非常に高いため他薬との相互作用が問題となっている。またいずれの薬物も出血傾向を呈する。

DIC (disseminated intravascular coagulation ; 播種性血管内凝固) は全身の血管内で血液凝固が進み、循環不全による臓器障害や、血液凝固因子の過剰な消費による出血症状を来す病態であり、白血病、固形腫瘍、感染症や産科疾患などが原因となる。その治療は抗凝固作用を期待して広くヘパリン (静脈内投与ないし皮下投与) が使用されているが、薬物そのものに出血助長作用があり、またアンチトロンビンIII濃度低下により充分な作用が得られないなどの欠点がある。合成蛋白分解酵素阻害薬も処方されるが、有効性が必ずしも明確ではない。

敗血症では、感染した菌体成分が凝固反応を惹起し、DICを発症することがある。しかし敗血症に対して有効な薬物は極めて少なく、これまでにaPC (activated Protein C ; 活性化プロテインC) が米国で認可されているのみである。

その他の血液凝固系が関与する病態、例えば冠動脈症候群、末梢循環不全等においても、ヘパリンや合成抗トロンビン薬などの抗凝固薬が処方されるが、連日投与が必要なため患者のQOL (Quality of Life) は低い。したがって、作用が長時間

(数週間) 持続し出血傾向を呈さない抗血栓薬は、血栓症を予防しつつ患者のQOLを向上させることができる。

血栓は血小板と血液凝固系が活性化することにより形成され、一般には動脈血栓には血小板が、静脈血栓には凝固系が主として働くと考えられている。血液凝固系が活性化され生成されたトロンビンは血栓網の主体となるフィブリンを生成するとともに、血管内皮上に存在するトロンボモデュリンと結合して性質が変化し、PC (Protein C) を活性化させる。活性化されたPC (aPC) はprotein Sを補酵素として、Factor VaおよびVIIIaを不活化し凝固系の回転を抑制する方向に働く。さらにaPCはPAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) やTAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) などの線溶阻害物質抑制作用も有するため、線溶系を促進する。したがってaPCは活性化した血液凝固系に対するネガティブフィードバック機構として重要な働きをすると考えられており、実際、先天性PC欠乏症、あるいは (Factor Va 変異による) aPC不応症は血栓症の発現因子の一つであることからもaPCの血栓症における役割の重要性が裏付けられる。さらに近年では、aPCが血管内皮に作用し抗炎症作用を有することが示唆されており (J. Biol. Chem. 2001; 276:11199-11203) 、また敗血症モデルにおいて死亡率を改善し (J. Clin. Invest. 1987; 79:918-925) 、その作用は抗凝固作用だけでは説明できないことも報告されている (Blood 1991; 78:364-368) 。これらのことは、aPCが血栓症および敗血症の治療および予防に有効であることを示している。

しかしながらaPCそのものを薬物として用いる場合、血中半減期が20~30分と非常に短いために静脈内持続投与あるいは長期にわたる連続投与が必要であり、医療経済学的に、また患者のQOLからも不都合である。半減期が短い理由は、aPCが生体内の不活化物質、すなわちPCIや α 1-antitrypsin (AAT) などにより非可逆的に不活化されることである。これらのうち生理的に重要な役割を果たしているのはPCIと考えられており (Fibrinolysis & Proteolysis 2000; 14:133-145) 、実際、aPC/PCI複合体の血中濃度は、急性冠症候群、DIC、深部静脈血栓症などの病態で上

昇していることが報告されている (Blood Coagul. Fibrinolysis 2001; 12:503-510; Am. J. Hematol. 2000; 65:35-40; Thromb. Haemost. 2001; 86:1400-1408)。
。

PCIは、aPCとアシル酵素複合体を形成することにより非可逆的に酵素活性を阻害する (J. Biochem. 1984; 95:187-195)。それのみならず、aPCの生成酵素であるトロンビン/トロンボモデュリン (Thr/TM) 複合体を阻害し、aPCの生成を抑制する (Blood 1998; 91:1542-1547)。すなわち、PCIはaPCの生成および活性の両方を阻害することによってaPCの働きを抑制している。したがってPCIの作用を阻害することにより、内因的に生成されるaPC、あるいは外因的に投与されるaPCの作用を増強することができ、効果的な抗血液凝固作用を得ることができる。

発明の開示

本発明は、aPCの生成および酵素活性を阻害するPCIに対し、中和作用を有する抗PCI抗体およびその利用を提供することを課題とする。

PCI (Suzuki, K. et al., J. Biol. Chem. 1983, 258:163-168; Suzuki, K., Fibrinolysis Proteolysis 2000, 14: 133-145) は血中に存在する可溶性蛋白であり、その半減期は23時間である。そこでこの蛋白に対する中和抗体を作製し、十分量投与すれば、長時間持続する抗血液凝固薬となる。

前述したように、PCIは (1) Thr/TM複合体によるaPC生成の阻害作用 (すなわちPCの活性化阻害作用) 、および (2) aPCの活性阻害作用を有する。そこで本発明者らは、PCIに対するモノクローナル抗体を産生するハイリドーマを作製し、PCIの二つの作用それぞれについて阻害作用のスクリーニングを行なった。その結果、(1)、(2) それぞれについて阻害作用を有する抗体を単離することに成功し、その一部は両方の作用を阻害した。本発明の抗体は、aPCの作用増強を通して血液凝固系の働きを抑制するため、血栓症の治療および予防のために極めて有用である。また本発明の抗体は、aPCによる敗血症の治療等において、aPCと併用して用いるこ

とにより、血中におけるaPCの不活化を抑制することによりaPCの作用を増強する薬剤として利用することができる。

すなわち本発明は、aPCの生成および酵素活性を阻害するPCIに対し、中和作用を有する抗PCI抗体およびその利用に関し、より具体的には、請求項の各項に記載の発明に関する。なお本発明は、請求項の各項に記載の発明の1つまたは複数（または全部）の所望の組み合わせからなる発明、特に、同一の独立項（他の項に記載の発明に包含されない発明に関する項）を引用する項（従属項）に記載の発明の1つまたは複数（または全部）の所望の組み合わせからなる発明にも関する。各独立項に記載の発明には、その従属項の任意の組み合わせからなる発明も意図されている。すなわち本発明は、以下の発明を含む。

〔1〕抗PCI抗体であって、（a）活性化プロテインC（aPC）活性に対するプロテインCインヒビター（PCI）の阻害作用を阻害する活性、または（b）トロンビン/トロンボモデュリン（Thr/TM）複合体による活性化プロテインC（aPC）生成に対するプロテインCインヒビター（PCI）の阻害作用を阻害する活性、の少なくともいずれかを有する抗体、

〔2〕抗PCI抗体であって、（a）活性化プロテインC（aPC）活性に対するプロテインCインヒビター（PCI）の阻害作用を阻害する活性、および（b）トロンビン/トロンボモデュリン（Thr/TM）複合体による活性化プロテインC（aPC）生成に対するプロテインCインヒビター（PCI）の阻害作用を阻害する活性、の両方を有する抗体、

〔3〕PC19G8、PC23A7、PC23D8、PC30G1、PC31E2、PC31F1、およびPC39C6からなる群より選択される抗体の可変領域を含む抗体と、抗体認識部位が競合する、

〔1〕または〔2〕に記載の抗体、

〔4〕〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の抗体であって、以下の（a）から（f）のいずれかのアミノ酸配列からなる相補性決定領域またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する抗体、

(a) 配列番号: 49、50、および51に記載のアミノ酸配列、

(b) 配列番号: 55、56、および57に記載のアミノ酸配列、

(c) 配列番号: 52、53、54およびに記載のアミノ酸配列、

(d) 配列番号: 58、59、60およびに記載のアミノ酸配列、

(e) 配列番号: 25、31、および36に記載のアミノ酸配列、

(f) 配列番号: 41、45、および48に記載のアミノ酸配列、

[5] 抗体がヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体断片、一本鎖抗体、およびダイアボディーからなる群より選択される、[1]から[4]のいずれかに記載の抗体、

[6] [1]から[5]のいずれかに記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物、

[7] さらにプロテインCおよび/または活性化プロテインCを含む、[6]に記載の組成物、

[8] 活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/または進展する疾患の予防または治療に用いられる医薬組成物である、[6]または[7]に記載の組成物、

[9] 疾患が血液凝固反応の亢進および/または炎症反応の亢進によって惹起される疾患である[8]に記載の組成物、

[10] 血液凝固反応の亢進および/または炎症反応の亢進によって惹起される疾患が、敗血症、播種性血管内凝固症候群、動脈血栓症、および静脈血栓症からなる群より選択される、[9]に記載の組成物、

[11] 活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/または進展する疾患を予防または治療する方法であって、(a) プロテインCおよび/または活性化プロテインC、並びに (b) [1]から[5]のいずれかに記載の抗体、を投与する工程を含む方法、

[12] 活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/また

は進展する疾患を予防または治療する方法であって、〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の抗体を投与する工程を含む方法、

〔13〕活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/または進展する疾患の予防または治療に使用されるキットであって、(a)〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の抗体、および(b)プロテインC、活性化プロテインC、またはその両方、を含むキット、

〔14〕活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/または進展する疾患の予防または治療に使用されるキットであって、(a)プロテインC、活性化プロテインC、および〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の抗体、および(b) (i)治療有効量のプロテインCおよび/または活性化プロテインC、並びに(ii)該抗体、を併用することの記載または該記載へのリンクを含む記録媒体、を含むキット。

本発明は、aPCの生成および/または酵素活性を阻害するPCIに対し、中和作用を有する抗PCI抗体およびその利用を提供する。PCIは、(1) Thr/TM複合体によるaPC生成(すなわちPCの活性化)に対する阻害作用、および(2) aPCの活性阻害作用を有するが、本発明の抗体は、PCIが持つこの(1)または(2)の活性のいずれか、より好ましくは(1)および(2)の両方の活性を有意に阻害する働きを有している。これらの活性の阻害は、例えば実施例に記載した方法またはその他の方法により測定することができる。具体的には、PCIによるaPCの活性阻害作用は、PCIを抗PCI抗体とインキュベートした後、これをaPC溶液に加えてインキュベートし、aPCの活性を測定する。PCIを加えなかった場合(PCIによる阻害なしの条件下のaPC活性)および抗PCI抗体を加えなかった場合(PCIにより阻害した場合のaPC活性)のaPC活性の値を基に、抗PCI抗体がPCIによるaPC活性の阻害作用を阻害した割合が決定される。抗体とPCIとのインキュベーションにより、抗体を加えなかった場合よりもaPC活性に対するPCIの阻害の程度が低下すれば、この抗体はPCIが持つaPCの活性阻害作用を阻害する活性を有すると判断される。aPCの活性としては抗血液凝

固作用が挙げられ、例えば公知の方法によりAPTT（活性化部分トロンボプラスチック時間）を測定して定量することができる。あるいは発色基質 pyroGlu-Pro-Arg-pNA・HCl (S-2366) などの低分子化合物を用いてaPC活性をアッセイすることも可能である（実施例参照）。

Thr/TM複合体によるaPC生成に対するPCIによる阻害については、例えばPCI、抗PCI抗体、トロンビン(Thr)、およびトロンボモデュリン(TM)をインキュベートし、その後、PCを加えてaPCの生成反応を行う。その後、aPC活性を測定して生成したaPC量を測定する。PCIを加えなかった場合（PCIによる阻害なしの条件下のaPC生成）および抗PCI抗体を加えなかった場合（PCIにより阻害した場合のaPC生成）のaPC活性の値を基に、PCIの「Thr/TM複合体によるaPC生成に対する阻害作用」における抗PCI抗体の阻害の割合が決定される。抗体の添加により、抗体を加えなかった場合よりもaPC生成に対するPCIの阻害の程度が低下すれば、この抗体はPCIが持つ「Thr/TM複合体によるaPC生成に対する阻害作用」を阻害する活性を有すると判断される。aPCの活性は上記と同様に定量することができる。

また本発明は、PCIに対して中和作用を有する抗PCI抗体のスクリーニング方法であって、i) 抗PCI抗体を結合させたまたはさせていないPCIの、aPCの活性阻害作用を測定する工程、および ii) 該抗体を結合させていないPCIに比べ、該抗体を結合させたPCIの該阻害作用が抑制されるような抗体を選択する工程、を含む方法を提供する。また本発明は、PCIに対して中和作用を有する抗PCI抗体のスクリーニング方法であって、i) 抗PCI抗体を結合させたまたはさせていないPCIの、Thr/TM複合体によるaPC生成に対する阻害作用を測定する工程、および ii) 該抗体を結合させていないPCIに比べ、該抗体を結合させたPCIの該阻害作用が抑制されるような抗体を選択する工程、を含む方法を提供する。また本発明は、これらのスクリーニング方法により得ることができる抗体を提供する。本発明の抗体は、血中におけるaPCの生成および/または活性の阻害を防止することにより、aPCの体内での生成量および/または寿命を延長させて活性を増強することが可能である。

本発明の抗PCI抗体は、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、またはそれらの抗体の変異体であってもよい。均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。

本発明における「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団、即ち、集団を構成する個々の抗体が、天然において起こり得る少量で存在する変異体を除いては均一である抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して作用するものである。さらに、異なる抗原決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む慣用なポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原決定基に向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンにより汚染されていないハイブリドーマ培養により合成される点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団より得られた抗体の特性を示唆するものであって、抗体が特定の方法により製造されることを限定するものではない。例えば、本発明において用いられるモノクローナル抗体を、例えばハイブリドーマ法 (Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975))、または、組換え方法(米国特許第4,816,567号)により製造してもよい。本発明において使用するモノクローナル抗体はまた、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい (Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) ; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991))。本発明におけるモノクローナル抗体には、特に、重鎖 (H鎖) 及び/または軽鎖 (L鎖) の一部が特定の種、または特定の抗体クラス若しくはサブクラス由来であり、鎖の残りの部分が別の種、または別の抗体クラス若しくはサブクラス由来である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、抗体変異体、並びに抗体の断片が含まれる (米国特許第4,816,567号; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

本発明において、「抗体変異体」とは、1またはそれ以上のアミノ酸残基が改変さ

れた、抗体のアミノ酸配列バリエントを指す。例えば、抗体の可変領域を、抗原との結合性等の抗体の生物学的特性を改善するために改変することができる。このような改変は、部位特異的変異 (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985) 参照) 、PCR変異、カセット変異等の方法により行うことができる。このような変異体は、抗体の重鎖若しくは軽鎖の可変領域のアミノ酸配列と少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列の同一性を有する。本明細書において配列の同一性は、配列同一性が最大となるように必要に応じ配列を整列化し、適宜ギャップ導入した後、元となった抗体のアミノ酸配列の残基と同一の残基の割合として定義される。

具体的には、塩基配列およびアミノ酸配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) のウェブサイトを参照; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。例えば以下の方法により作製することができる。

動物の免疫に用いるPCIとしては、組換えDNA法又は化学合成により調製したPCI

のアミノ酸配列の全部若しくは一部のペプチドなどが挙げられる。ヒトおよびその他の哺乳動物のPCIのアミノ酸配列は公知である (Suzuki, K. et al., J. Biol. Chem. 1987, 262:611-616)。哺乳動物のPCIとしては、例えばマウス、ラット、またはウシなどのPCIを用いることができるがこれらに制限されない (Zechmeister-Machhart, M., et. al., Gene, 186, (1), 61-66, 1997; Wakita, T., et. al., FEBS Lett., 429, 263-268, (3), 1998; Yuasa, J., et. al., Thromb. Haemost. 83, (2), 262-267, 2000)。組み換えPCI蛋白質は、例えば実施例に記載したようにして調製することができる。抗原としてはPCIまたはその部分ペプチド自体を用いることもできるし、キャリアー蛋白質に結合させて免疫することもできる。キャリアー蛋白質を用いる場合は、例えば抗原であるPCIをキャリアー蛋白質(例えばサイログロブリン)に結合させた後、アジュバントを添加する。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイントの不完全なアジュバント等が挙げられ、これらの何れのものを混合してもよい。

上記のようにして得られた抗原を哺乳動物、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウマ、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に投与する。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射などにより行う。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは4~21日間隔で免疫する。抗原蛋白質の免疫量は1回にマウス1匹当たり、例えば 10~100 μ g (例えば20~60 μ g) を用いることができる。

初回免疫前および2回目以降の免疫から3~7日後に動物から採血し、血清を抗体価について分析する。また、免疫応答を増幅するため、ミョウバン等の凝集剤が好ましくは用いられる。選択された哺乳動物抗体は通常、抗原に対して十分に強い結合親和性を有する。抗体の親和性は、飽和結合、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)、及び競合分析(例えば、放射性免疫分析)により決定することができる。

ポリクローナル抗体のスクリーニング法としては、*Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratoriey, Harlow and David Lane edit. (1988)) に記載されるような慣用の交差結合分析を行うことができる。また、代わりに、例えば、エピトープマッピング (Champe et al., *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995)) を行ってもよい。ポリペプチドまたは抗体の効力の測定方法として好ましいのは、抗体結合親和性の定量化を用いた方法であるが、その他の態様では、それに加えて、または結合親和性測定に代えて、抗体の1若しくはそれ以上の生物学的特性を評価する方法を含む。このような分析法は特に、抗体の治療的な有効性を示すので有用である。通常、必ずしもではないが、このような分析において改善された特性を示す抗体はまた、結合親和性も増幅されている。

モノクローナル抗体の調製におけるハイブリドーマの作製は、例えば、ミルステインらの方法 (Kohler, G., and Milstein, C., *Methods Enzymol.* 1981, 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。抗体産生細胞と融合させるミエローマ (骨髄腫) 細胞として、マウス、ラット、ヒトなど種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地 (例えばHAT培地) で生存できず、融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが用いられる。一般的に8-アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、ヒポキサンチングアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼを欠損し、ヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン (HAT) 培地に生育できないものである。ミエローマ細胞は、既に公知の種々の細胞株、例えば P3x63Ag8.653 (*J. Immunol.* (1979) 123: 1548-1550) 、P3x63Ag8U.1 (*Current Topics in Microbiology and Immunology* (1978) 81: 1-7) 、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., *Eur. J. Immunol.* (1976) 6: 511-519) 、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., *Cell* (1976) 8: 405-415) 、SP2/0 (Shulman, M. et al., *Nature* (1978) 276: 269-270) 、F0 (de St. Groth, S. F. et al., *J. Immunol. Methods* (1980) 35: 1-21) 、S194 (Trowbridge, I. S., *J. Exp. Med.* (1978)

148: 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., *Nature* (1979) 277: 131-133)、P3 U1 (J. Exp. Med. 1979;150:580; Curr Top Microbiol. Immunol. 1978;81:1) 等が好適に使用される。また、ヒトミエローマ、及び、マウス-ヒトheteromyeloma セルラインも、ヒトモノクローナ抗体の產生に用いることができる (Kozbar, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Application*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。抗体產生細胞は、例えは最終の免疫日から2~3日後に犠牲死させた動物から採取する。抗体產生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞が挙げられるが、一般に脾臓細胞が用いられる。具体的には、前記各種動物から脾臓、リンパ節等を摘出又は採取し、これら組織を破碎する。得られる破碎物をPBS、DMEM、RPMI1640等の培地又は緩衝液に懸濁し、ステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うことにより目的とする抗体產生細胞を調製する。

次に、上記ミエローマ細胞と抗体產生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、MEM、DMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、ミエローマ細胞と抗体產生細胞とを、混合比 1:1~1:20 で融合促進剤の存在下、30~37°Cで 1~15分間接触させることによって行われる。細胞融合を促進させるためには、平均分子量1,000~6,000 (Da) のポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール又はセンダイウイルスなどの融合促進剤や融合ウイルスを使用した市販の細胞融合装置を用いて抗体產生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法等が挙げられる。すなわち、細胞懸濁液を適切な培地で希釈後、マイクロタイタープレート上にまき、各ウェルに選択培地 (HAT培地など) を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

また別の態様として、McCaffertyら (*Nature* 348:552-554 (1990)) により記載さ

れた技術を用いて製造された抗体ファージライプラリーより、抗体、または抗体断片を単離することができる。Clacksonら(Nature 352:624-628 (1991))、及びMarksら(J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991))は、各々、ファージライプラリーを用いたマウス及びヒト抗体の単離について記載している。また、高親和性(nM範囲)ヒト抗体のチェーンシャッフルリングによる製造(Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992))、そして、巨大なファージライプラリーを構築するための方法としてのコンビナトリアル感染、及びin vivo組換え(Waterhouse et al., Nucleic Acids Res. 21:2265-2266 (1993))などが知られている。これらの技術も、モノクローナル抗体の単離のために従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に代えて利用し得る。

本発明の抗PCI中和抗体は、好適には以下のスクリーニングにより選択することができる。

- 1次スクリーニング

抗体の結合特異性を、公知技術、例えばEIA (エンザイムイムノアッセイ)、RIA (ラジオイムノアッセイ)、ELISA (酵素連結イムノソルベントアッセイ)、HTRF (homogenous time-resolved fluorescence)、または蛍光免疫法等 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) により測定し、PCIへ結合するものを選択する。

- 2次スクリーニング

aPC/PCIアッセイおよび/またはThr/TM/PCIアッセイを行い、PCIに対する阻害の度合いが相対的に強い抗体を選択する。aPC/PCIアッセイとは、上記した、PCIが持つaPCの活性阻害作用のアッセイであり、Thr/TM/PCIアッセイとは、上記した、PCIが持つThr/TM複合体によるaPC生成 (PCの活性化) に対する阻害作用のアッセイである。これらのPCIの作用に対する阻害の程度を測定し、その阻害の程度が相対的に高い抗体を選択する。例えば、ハイブリドーマなどの抗体産生細胞から得られた抗体を用いてアッセイしているならば、目的の活性を有する抗体を産生す

る抗体産生細胞を同定し、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により生育させる (Goding, *Monoclonal Antibodies:Principals an Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。培養培地としては、例えば D-MEMまたはRPMI-1640培地を用いることができる。スクリーニングを繰り返して、より強い抗PCI中和抗体を產生するハイブリドーマを選択することにより、ハイブリドーマのクローニングを行うことが可能である。本発明は、本発明の抗体を產生するハイブリドーマに関する。

ハイブリドーマ培養上清 (1/5 (vol/vol)) を用いた上記aPC/PCIアッセイにおいては、PCI非添加の場合の値を100、ハイブリドーマ培養上清の代わりにハイブリドーマ培養のための培養液 (例えばHAT培地) を用いた場合を0としたPCI阻害活性の相対値で、好ましくは45以上、より好ましくは48以上、より好ましくは50以上、より好ましくは60以上、より好ましくは70以上、より好ましくは80以上、より好ましくは90以上の阻害活性を示すものが選択される。本発明は、このaPC/PCIアッセイにおいて、培養上清 (1/5 (vol/vol)) 中のPCI活性阻害の相対値が好ましくは45以上、より好ましくは48以上、より好ましくは50以上、より好ましくは60以上、より好ましくは70以上、より好ましくは80以上、より好ましくは90以上であるハイブリドーマを提供する。ハイブリドーマ培養上清のaPC/PCIアッセイは、例えば実施例に記載の方法に従って実施する。

ハイブリドーマ培養上清からは、常法により抗体を精製することができる。本発明の抗体は、抗体非添加の場合の値を100%、PCI非添加の場合を0%としたaPC/PCIアッセイにおいて、50%阻害濃度が好ましくは $100 \mu\text{g/ml}$ 以下、より好ましくは $80 \mu\text{g/ml}$ 以下、より好ましくは $60 \mu\text{g/ml}$ 以下、より好ましくは $50 \mu\text{g/ml}$ 以下、より好ましくは $40 \mu\text{g/ml}$ 以下、より好ましくは $25 \mu\text{g/ml}$ 以下、より好ましくは $15 \mu\text{g/ml}$ 以下、より好ましくは $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以下である。あるいは本発明の抗体は、このaPC/PCIアッセイにおいて、抗体濃度 $25 \mu\text{g/ml}$ におけるPCI阻害の相対値が、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、より好ましくは

70%以上、より好ましくは80%以上である。精製抗体のaPC/PCIアッセイは、例えば実施例に記載の方法に従って実施する。50%阻害濃度を決定するには、抗体濃度を変えてアッセイを行い、グラフを作成して50%阻害に相当する抗体濃度を求めればよい。

また本発明の抗体は、好ましくはThr/TM/PCIに対する阻害活性を有している。本発明の抗体は、抗体非添加の場合の値を100%、PCI非添加の場合を0%としたThr/TM/PCIアッセイにおいて、50%阻害濃度が好ましくは200 μ g/ml以下、より好ましくは150 μ g/ml以下、より好ましくは100 μ g/ml以下、より好ましくは80 μ g/ml以下、より好ましくは50 μ g/ml以下、より好ましくは30 μ g/ml以下、より好ましくは25 μ g/ml以下である。あるいは本発明の抗体は、このThr/TM/PCIアッセイにおいて、抗体濃度25 μ g/mlにおけるPCI阻害の相対値が、好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上、より好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上である。精製抗体のThr/TM/PCIアッセイは、例えば実施例に記載の方法に従って実施する。50%阻害濃度を決定するには、抗体濃度を変えてアッセイを行い、グラフを作成して50%阻害に相当する抗体濃度を求めればよい。

本発明の抗体は、PC/PCIアッセイにおけるPCI阻害活性、またはThr/TM/PCIアッセイにおけるPCI阻害活性のどちらかを有していればよいが、より好ましくは、aPC/PCIアッセイにおけるPCI阻害活性、およびThr/TM/PCIアッセイにおけるPCI阻害活性の両者を有している。すなわち本発明の抗体としては、上記のaPC/PCIアッセイおよびThr/TM/PCIアッセイにおける50%阻害濃度が、それぞれ好ましくは100および200 μ g/ml以下、より好ましくは80および150 μ g/ml以下、より好ましくは60および100 μ g/ml以下、より好ましくは50および80 μ g/ml以下、より好ましくは40および50 μ g/ml以下、より好ましくは25および30 μ g/ml以下、より好ましくは15および25 μ g/ml以下、より好ましくは12.5および25 μ g/ml以下である抗体が含まれる。

本発明の抗体は、一般に、PCIとの結合力が強いものほど好ましいと考えられる

。本発明の抗体は、PCIと相互作用における解離定数 (KD) が、好ましくは50 nM以下、より好ましくは20 nM以下、より好ましくは10 nM以下、より好ましくは5 nM以下、より好ましくは3 nM以下、より好ましくは1 nM以下、より好ましくは0.8 nM以下、より好ましくは0.6 nM以下、より好ましくは0.4 nM以下、より好ましくは0.2 nM以下である。解離定数や、結合速度定数 (ka) 、解離速度定数 (kd) 、最大結合量 (Rmax) などの結合速度論的パラメーターは、例えばBIACOREなどの表面プラズモン共鳴分析等により決定することができる。

また、本発明の抗体は、好ましくは血液によるaPCの不活性化を抑制する活性を有している。本発明の抗体は、血液によるaPCの不活性化を、好ましくは10%以上、より好ましくは15%以上、より好ましくは20%以上、より好ましくは25%以上、より好ましくは30%以上抑制する抗体である。このような抑制レベルは不活性化抑制率(%)と定義され、血液により不活性化した場合のaPCの活性と同レベルのaPC活性を0%、しない場合のaPC活性と同レベルのaPC活性を100%とした相対値で表される。

不活性化抑制率は適宜抗体の用量を変えながら至適条件で測定すればよく、具体的には、以下の手順で決定することができる。10 μ g/mLのaPC (SIGMA、#P-2200) 溶液10 μ Lと40 μ Lの抗体溶液 (ハイブリドーマのスクリーニングであれば、例えばハイブリドーマ培養上清) あるいはコントロールとして抗体を含まない溶液 (例えばミエローマ細胞の培養上清またはHAT培地など) を混合し、室温で一定時間 (例えば60分) インキュベートする。この混合液に血漿 (例えばヒト標準血漿) を50 μ L添加し、さらに室温で一定時間 (例えば60分) インキュベートする。APTT試薬 (例えば DADE BEHRING、GAA-200A) 50 μ Lを添加する。血漿とインキュベーションを行わないaPCの血液凝固時間は、APTT試薬添加直前に血漿に加えて測定する。例えば 37°Cで3分間インキュベートした後、20 mmol/L CaCl₂ (例えば DADE BEHRING、GMZ-310) 50 μ Lを添加し、凝固までの時間を測定する。血液凝固時間は、血液凝固自動測定装置 (例えば Amelung、KC-10A) などにより測定すること

ができる。

血漿とインキュベートしなかったaPCを加えた場合の凝固時間 (a) を100%、コントロールとして抗体を含まない溶液（例えば上記のようにミエローマ細胞の培養上清またはHAT培地など）とインキュベート後に血漿とインキュベートしたaPCを加えた場合の凝固時間 (b) を0%とし、該ハイブリドーマ培養上清などの抗体溶液とインキュベート後に血漿とインキュベートしたaPCを加えた場合の凝固時間 (c) から、ハイブリドーマ培養上清などの抗体溶液の凝固時間延長に対する作用を求める（不活性化抑制率(%) = $\{(c-b)/(a-b)\} \times 100$ ）。この値が大きいほど、aPC不活性化に対する抑制作用が強いと判断される。S-2366等の基質化合物を用いてaPC活性を測定する場合でも、上記と同様に抗体とインキュベートせずに血漿で不活性化させたaPC、および血漿とインキュベートしないaPCを比較に用いてaPC活性を測定し、不活性化抑制率(%)を算出することができる。

本発明の抗体は、例えばaPCまたはThrombinとの相互作用または選択性に関与するPCI部位に結合する抗体であってよい。PCIがThrombinおよびaPCと反応する部位は、シグナルペプチドが切断された後のヒトPCIにおけるArg³⁵⁴-Ser³⁵⁵ (Suzuki, K. et al., J. Biol. Chem. 1987, 262: 611-616) である。また、PCIのThrombinへの選択性に関与する部位は Phe³⁵³、PCIのaPCへの選択性に関与する部位は Thr³⁵² である (Cooper, S. T. et al., Biochemistry 1995, 34: 12991-12997; Cooper, S. T. and Church, F. C., Biochimica et Biophysica Acta, 1246, 29-33, 1995)。本発明の抗体は、例えばPCI中のこれらのいずれかのアミノ酸あるいはその近傍（例えば10アミノ酸以内の部位）に結合する抗体が含まれる。このような抗体を作製するには、目的のPCI部分を含むオリゴペプチドを合成し、それを抗原として動物に免疫して抗体を産生させればよい。

また、PCIの作用の一つであるaPCの活性阻害はHeparin依存的であり、PCIのArg²⁷⁸、Arg³⁶²、および Lys²⁷⁶ 残基が、Heparinを介したPCI-aPCの相互作用に関与している (Lei Shen, et al., Thromb. Haemost., 82, 72-79, 1999)。従って、これ

らのアミノ酸またはその近傍に結合する抗体は、PCIのaPC阻害を抑制する抗体の候補となる。

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等が挙げられる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10~20%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地、又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37°C、5%CO₂濃度）で2~14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。腹水形成法においては、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にハイブリドーマを投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~4週間後に腹水又は血清を採取する。腹水形成を促進するために、例えばプリスタン（2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane）などを予め腹腔内投与することができる。

本発明で使用される抗体は、プロテインA-セファロース、プロテインG-セファロース、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、硫黄塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

また、本発明では、上記の方法にしたがって得られた抗体の遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて產生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Lerrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み

込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。本発明は、本発明の抗体を発現する細胞を提供する。本発明の抗体を発現する細胞としては、このような抗体遺伝子で形質転換された細胞、およびハイブリドーマが含まれる。

本発明の抗体として特に好適なのは、実施例において単離されたいずれかのモノクローナル抗体 (PC19G8, PC23A7, PC23D8, PC30G1, PC31E2, PC31F1, または PC39C6) の可変領域を含む抗体と抗体結合部位が重複する (または同一の) 抗体である。このような抗体を、本発明においては、該モノクローナル抗体 (PC19G8, PC23A7, PC23D8, PC30G1, PC31E2, PC31F1, または PC39C6) のPCI結合部位と実質的に同じ部位に結合する抗体と呼ぶ。2つの抗体が抗原蛋白質の同じ部位に結合するかどうかは、例えば競合実験により決定することができる。具体的には、第一の抗PCI抗体とPCIとの結合が、第二の抗PCI抗体によって競合阻害を受けるとき、第一の抗体と第二の抗体は同じ抗原部位に結合していると判断される。例えば、PC19G8, PC23A7, PC23D8, PC30G1, PC31E2, PC31F1, または PC39C6の抗体、あるいは、配列番号：8、9、10、11、12、13、または14に記載のアミノ酸配列を含むH鎖可変領域に対して、それぞれ配列番号：15、16、17、18、19、20、または21に記載のアミノ酸配列を含むL鎖可変領域を組み合わせた抗体のいずれかと、抗体結合部位が競合する抗体は、本発明の抗体に含まれる。あるいは、上記のモノクローナル抗体のエピトープを、PCIの部分ペプチドなどを用いた公知のエピトープマッピング法により解析し、同定されたエピトープを含むペプチドを抗原に用いて、これに結合する抗体を調製することにより、上記モノクローナル抗体のPCI結合部位と実質的に同じ部位に結合する抗体を得ることもできる。このような抗体は、aPC生成および/またはaPC活性に対して実施例で単離した抗体と同様の阻害作用を発揮することが期待される。このように、実施例で単離した抗体のPCI結合部位と実質的に同じ部位に結合する抗体であって、aPC活性に対するPCIの阻害作用を阻害する活性を有する抗体および/またはThr/TM複合体によるaPC生成に対する

るPCIの阻害作用を阻害する活性を有する抗体は本発明に含まれる。

また本発明の抗体には、実施例において単離されたいずれかのモノクローナル抗体 (PC19G8, PC23A7, PC23D8, PC30G1, PC31E2, PC31F1, または PC39C6) の相補性決定領域 (CDRs) またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を含む抗体が含まれる。機能的に同等とは、実施例において単離されたいずれかのモノクローナル抗体のCDRsのアミノ酸配列と類似したアミノ酸配列を有し、PCIに結合してその機能を阻害する作用を有することを言う。CDRとは抗体の可変領域 (V領域とも言う) に存在する抗原への結合の特異性を決定している領域であり、H鎖とL鎖にそれぞれ3箇所ずつ存在し、それぞれN末端側からCDR1、CDR2、CDR3と命名されている。CDRを挟むようにフレームワークと呼ばれるアミノ酸配列の保存性の高い4つの領域が介在する。CDRは他の抗体に移植することが可能であり、所望の抗体のフレームワークと組み合わせることにより組み換え抗体を作製することができる。また抗原に対する結合性を維持しながら1または数個のCDRのアミノ酸を改変することが可能である。例えば、CDR中の1または数個のアミノ酸を、置換、欠失、および/または付加することができる。

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V) 、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T) 、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P) 、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y) 、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M) 、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q) 、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H) 、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。これらの各グループ内のアミノ酸の置換を保存的置換と称す。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学

的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucl. Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、各CDRのアミノ酸の40%以内であり、好ましくは35%以内であり、さらに好ましくは30%以内（例えば、25%以内）である。アミノ酸配列の同一性は本明細書に記載したようにして決定すればよい。

本発明に含まれる抗体を例示すれば、例えば D(T/Y)(F/Y)(M/I)H (配列番号：49)、RID(Y/L)(V/E)(N/K)(G/V)N(T/I)(K/I)YDP(K/N)FQ(G/D) (配列番号：50)、およびGGYDV(R/P)(E/S)FAY (配列番号：51) (スラッシュで区切られたアミノ酸は、それらのいずれかのアミノ酸であることを表す) のアミノ酸配列からなる3つのCDRまたはこれらと機能的に同等のCDRを有する抗体が挙げられる。それぞれのアミノ酸配列は、抗体H鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3に対応する。これらのCDRを、所望のH鎖可変領域のフレームワークの間のCDR1、CDR2、およびCDR3に相当する位置に挿入すれば、本発明のPCI中和抗体を作製することができる。このような抗体のH鎖CDRとして好ましいアミノ酸配列をより具体的に例示すれば、CDR1としてはDTFMH (配列番号：22) またはDYYIH (配列番号：23)、CDR2としては RIDYVN GNTKYDPKFQG (配列番号：26)、RIDLVNVNTKYDPNFQD (配列番号：27)、または RIDLEKGNIIYDPKFQG (配列番号：28)、CDR3としては GGYDVREFAY (配列番号：32)、または GGYDVPSFAY (配列番号：33) が用いられる。また、上記の各CDRのアミノ酸は、適宜置換などにより改変してもよい。例えば、各CDRのアミノ酸を保存的に置換することは本発明の範疇に含まれる。より具体的には、各CDRは、モノクローナル抗体 PC23D8, PC19G8, PC23A7、または PC39C6 のH鎖のCDR1, 2、および3の組み合わせを用いることができる（図5参照）。これらの抗体は、上記クローンと同等のPCI中和活性を有することが期待される。

上記のH鎖CDRを含む抗体には、適宜抗体L鎖の可変領域を組み合わせて用いることができる。L鎖CDRとしては、例えば SA(T/S)SS(L/V)(I/S)YMH (配列番号：55)、STSNLASGVPA (配列番号：56)、およびRSSYPFT (配列番号：57) のアミノ酸配列からなるCDRまたはこれらと機能的に同等のCDRを組み合わせることが好ましい。それぞれのアミノ酸配列は、抗体L鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3に対応する。また、これらのL鎖CDRsは、上記のH鎖とは独立に用いてもよい。これらのCDRは、所望のL鎖可変領域のフレームワークの間のCDR1、CDR2、およびCDR3に相当する位置に挿入される。このような抗体のL鎖CDRとして好ましいアミノ酸配列をより具体的に例示すれば、CDR1としては SATSSLIYMH (配列番号：37) またはSASSSVSYM (配列番号：38)、CDR2としては STSNLASGVPA (配列番号：42)、CDR3としては RS SYPFT (配列番号：46) が用いられるが、これらに制限されない。

具体的には、本発明の抗体には、以下のH鎖相補性決定領域を有する抗体であつて、Thr/TM複合体によるaPC生成に対するPCIの阻害作用を阻害する活性および/またはaPC活性に対するPCIの阻害作用を阻害する活性を有する抗体が含まれる。

- (a) 配列番号：49、50、および51に記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域。
- (b) 配列番号：49、50、および51の任意のアミノ酸を保存的置換した配列からなる相補性決定領域。
- (c) 配列番号：49の3個以内、配列番号：50の8個以内、および配列番号：51の5個以内のアミノ酸が、置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなる相補性決定領域。
- (d) 配列番号：49、50、および51とそれぞれ70%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる相補性決定領域。
- (e) におけるアミノ酸の改変数は、好ましくは配列番号：49の2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：50の7個以内、さらに好ましくは6個以内、さらに好ましくは5個以内、さらに好ましくは4個以内、さらに好ま

しくは3個以内である。また好ましくは配列番号：51の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また (d) における同一性は、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である。

また本発明の抗体には、以下のL鎖相補性決定領域を有する抗体であって、Thr/TM複合体によるaPC生成に対するPCIの阻害作用を阻害する活性および/またはaPC活性に対するPCIの阻害作用を阻害する活性を有する抗体が含まれる。

(a) 配列番号：55、56、および57に記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(b) 配列番号：55、56、および57の任意のアミノ酸を保存的置換した配列からなる相補性決定領域。

(c) 配列番号：55の5個以内、配列番号：56の5個以内、および配列番号：57の4個以内のアミノ酸が、置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(d) 配列番号：55、56、および57とそれぞれ70%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(c) におけるアミノ酸の改変数は、好ましくは配列番号：55の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：56の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：57の3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また (d) における同一性は、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である。特に、上記のH鎖相補性決定領域とL鎖相補性決定領域の両方を有する抗体は、本発明の抗体として好適である。

また本発明の抗体としては、RYWMS (配列番号：52) 、EINPDSSTI (N/T) YT (P/S) SLKD (配列番号：53) 、および(F/L)FYYGTPDY (配列番号：54) のアミノ酸配列か

らなるCDRまたはこれらと機能的に同等のCDRを有する抗体が挙げられる。上記と同様に、それぞれのアミノ酸配列は、抗体H鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3に相当する。このような抗体のH鎖CDRとして好ましいアミノ酸配列をより具体的に例示すれば、CDR1としては RYWMS (配列番号: 24)、CDR2としては EINPDSSTINYTPSLKD (配列番号: 29) または EINPDSSTITYTSSLKD (配列番号: 30)、CDR3としては FFYY GTPDY (配列番号: 34) または LFYYGTPDY (配列番号: 35) が挙げられる。具体的には、モノクローナル抗体 PC30G1またはPC31F1のH鎖のCDR1, 2, および3の組み合わせを用いることができる。これらの抗体は、PC30G1またはPC31F1と同等のPCI中和活性を有することが期待される。この場合はL鎖CDRsとして、例えば KASQDV (V/K)AVA (配列番号: 58)、S(A/T)SYRYTGVPD (配列番号: 59)、およびHYSSPPWT (配列番号: 60) のアミノ酸配列からなるCDRまたはこれらと機能的に同等のCDRを組み合わせることが好ましい。それぞれのアミノ酸配列は、抗体L鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3に対応する。また、これらのL鎖CDRsは、上記のH鎖とは独立に用いてもよい。L鎖CDRとして好ましいアミノ酸配列をより具体的に例示すれば、CDR1としては KASQDVIVAVA (配列番号: 39) または KASQDVVIKAVA (配列番号: 40)、CDR2としては SASYRYTGVPD (配列番号: 43) または STSYRYTGVPD (配列番号: 44)、CDR3としては HYSSPPWT (配列番号: 47) が用いられるが、これらの配列には制限はない。

具体的には、本発明の抗体には、以下のH鎖相補性決定領域を有する抗体であって、Thr/TM複合体によるaPC生成に対するPCIの阻害作用を阻害する活性および/またはaPC活性に対するPCIの阻害作用を阻害する活性を有する抗体が含まれる。

- (a) 配列番号: 52、53、および54に記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域。
- (b) 配列番号: 52、53、および54の任意のアミノ酸を保存的置換した配列からなる相補性決定領域。
- (c) 配列番号: 52の3個以内、配列番号: 53の8個以内、および配列番号: 54の5

個以内のアミノ酸が、置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(d) 配列番号：52、53、および54とそれぞれ70%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(c) におけるアミノ酸の改変数は、好ましくは配列番号：52の2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：53の7個以内、さらに好ましくは6個以内、さらに好ましくは5個以内、さらに好ましくは4個以内、さらに好ましくは3個以内である。また好ましくは配列番号：54の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また (d) における同一性は、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である。

また本発明の抗体には、以下のL鎖相補性決定領域を有する抗体であって、Thr/TM複合体によるaPC生成に対するPCIの阻害作用を阻害する活性および/またはaPC活性に対するPCIの阻害作用を阻害する活性を有する抗体が含まれる。

(a) 配列番号：58、59、および60に記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(b) 配列番号：58、59、および60の任意のアミノ酸を保存的置換した配列からなる相補性決定領域。

(c) 配列番号：58の5個以内、配列番号：59の5個以内、および配列番号：60の4個以内のアミノ酸が、置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(d) 配列番号：58、59、および60とそれぞれ70%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(c) におけるアミノ酸の改変数は、好ましくは配列番号：58の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：59の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。

しくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：60の3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また（d）における同一性は、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である。特に、上記のH鎖相補性決定領域とL鎖相補性決定領域の両方を有する抗体は、本発明の抗体として好適である。

また本発明の抗体としては、TYPIE（配列番号：25）、KFHPDNDTNYNEKFKG（配列番号：31）、およびGHDYDYGMDY（配列番号：36）のアミノ酸配列からなるCDRまたはこれらと機能的に同等のCDRを有する抗体が挙げられる。上記と同様に、それぞれのアミノ酸配列は、抗体H鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3に相当する。これらの抗体は、PC31E2と同等のPCI中和活性を有することが期待される。この場合はL鎖CDRとして、例えばKASQSVVDYDGDSYLN（配列番号：41）、GASNLESGTPA（配列番号：45）、およびSNEDPPT（配列番号：48）のアミノ酸配列からなるCDRまたはこれらと機能的に同等のCDRを組み合わせることが好ましい。それぞれのアミノ酸配列は、抗体L鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3に対応する。

具体的には、本発明の抗体には、以下のH鎖相補性決定領域を有する抗体であって、Thr/TM複合体によるaPC生成に対するPCIの阻害作用を阻害する活性および/またはaPC活性に対するPCIの阻害作用を阻害する活性を有する抗体が含まれる。

- （a）配列番号：25、31、および36に記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域。
- （b）配列番号：25、31、および36の任意のアミノ酸を保存的置換した配列からなる相補性決定領域。
- （c）配列番号：25の3個以内、配列番号：31の8個以内、および配列番号：36の5個以内のアミノ酸が、置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなる相補性決定領域。
- （d）配列番号：25、31、および36とそれぞれ70%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(c) におけるアミノ酸の改変数は、好ましくは配列番号：25の2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：31の7個以内、さらに好ましくは6個以内、さらに好ましくは5個以内、さらに好ましくは4個以内、さらに好ましくは3個以内である。また好ましくは配列番号：36の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また (d) における同一性は、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である。

また本発明の抗体には、以下のL鎖相補性決定領域を有する抗体であって、Thr/TM複合体によるaPC生成に対するPCIの阻害作用を阻害する活性および/またはaPC活性に対するPCIの阻害作用を阻害する活性を有する抗体が含まれる。

(a) 配列番号：41、45、および48に記載のアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(b) 配列番号：41、45、および48の任意のアミノ酸を保存的置換した配列からなる相補性決定領域。

(c) 配列番号：41の5個以内、配列番号：45の5個以内、および配列番号：48の4個以内のアミノ酸が、置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(d) 配列番号：41、45、および48とそれぞれ70%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる相補性決定領域。

(c) におけるアミノ酸の改変数は、好ましくは配列番号：41の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：45の4個以内、さらに好ましくは3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また好ましくは配列番号：48の3個以内、さらに好ましくは2個以内、さらに好ましくは1個である。また (d) における同一性は、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である。特に、上記のH鎖相補性決定領

域とL鎖相補性決定領域の両方を有する抗体は、本発明の抗体として好適である。

CDRのアミノ酸配列を改変するには、例えばアミノ酸配列を改変したCDRを含む可変領域をコードするオリゴヌクレオチドを合成し、これらを基にPCRにより可変領域をコードする核酸を生成させる。これを適当な発現ベクターに組み込んで発現させることにより、所望のCDRを有する抗体を得ることができる。例えば、オリゴヌクレオチドの合成時に塩基を混合させて、CDRの特定の位置に様々なアミノ酸を有する抗体をコードするDNAライプラリーを作製する。このライプラリーから、PCIに結合しその機能を抑制する抗体をコードするクローンを選択することによって、本発明の抗体を得ることができる。本発明は、本発明の抗体をコードする核酸、該核酸を含むベクター、および該核酸または該ベクターを含む宿主細胞に関する。核酸はDNAであってもRNAであってもよい。ベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルスベクター等の公知の所望のベクターであってよい。宿主細胞は、バクテリア、酵母、昆虫、植物細胞、および哺乳動物細胞などが含まれる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト化 (Humanized) 抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体などが挙げられ、例えばヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体が挙げられる。このような抗体は、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体などの非ヒト抗体の重鎖または軽鎖の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域に置き換えたものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (例えば、Jones e

t al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); Presta *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992) 参照)。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region ; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するよう作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 23 9400、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。

ヒト化抗体は、レシピエント抗体に導入させたCDRまたはフレームワーク配列のどちらにも含まれないアミノ酸残基を含んでいてもよい。通常、このようなアミノ酸残基の導入は、抗体の抗原認識・結合能力をより正確に至適化するため行われる。例えば必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878 参照)。また、ヒト抗体遺伝子の一部または全てのレパートリーを有するトランスジェニック (Tg) 動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる (*Nature Genetics* 7:13-21 (1994); *Nature Genetics* 15:146-156 (1997); *Nature* 368:856-859 (1994); 国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735 参照)。このようなTg動物は、具体的には、非ヒト哺乳動物の内在性免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) ベクターなどを介してヒト免疫グロ

プリン重鎖および軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物を、ノックアウト動物およびTg動物の作製、およびこれらの動物同士の掛け合わせにより作り出す。免疫グロブリン重鎖遺伝子座の機能的な不活性化には、例えば、J領域またはC領域(例えばC μ 領域)の一部に障害を導入することにより達成でき、免疫グロブリン軽鎖(例えば κ 鎖)の機能的不活性化には、例えば、J領域若しくはC領域の一部、またはJ領域及びC領域にまたがる領域を含む領域に障害を導入することにより達成可能である。

また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト化抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするcDNA、好ましくは該cDNAを含むベクターにより真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を產生する形質転換細胞を培養することにより、この抗体を培養上清中から得ることもできる。ここで、該宿主は例えば所望の真核細胞、好ましくはCHO細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞である。

さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する適当な発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考に実施することができる。

抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる

。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、Sf9, Sf21, Tn5など、あるいはカイコなどの個体が挙げられる。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバコ (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli) 、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。

本発明の抗体のアイソタイプとしては制限はなく、例えば IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 、IgM、IgA (IgA1, IgA2) 、IgDあるいはIgE等が挙げられるが、好ましくはIgGまたはIgMである。また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の断片又はその修飾物であってもよい。「抗体断片」とは、全長抗体の一部を指し、一般に、抗原結合領域または可変領域を含む断片のことである。例えば、抗体の断片としては、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv、または重鎖および軽鎖のFvを適当なリンクで連結させたシングルチェインFv (scFv) 、diabody (diabodies) 、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体などが挙げられる。従来、抗体断片は天然の抗体のプロテアーゼによる消化により製造されてきたが、現在では、遺伝子工学的に組み換え抗体として発現させること方法も公知である (Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); Brennan et al., Science 229:81 (1985); Co, M. S. et al., J. Immunol., 1994, 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology, 1

989, 178, 476-496, Academic Press, Inc. ; Plueckthun, A. & Skerra, A., Methods in Enzymology; 1989, 178, 476-496, Academic Press, Inc. ; Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 1989, 121, 663-669; Bird, R. E. et al., TIBTECH, 1991, 9, 132-137 参照)。

「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含むものである。この領域は1つの重鎖および軽鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである (V_H - V_L ダイマー)。各可変領域の3つの相補性決定領域 (CDR) が相互作用し、 V_H - V_L ダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。即ち、重鎖と軽鎖をあわせて6つのCDRが抗体の抗原結合部位として機能している。しかしながら、1つの可変領域 (または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分) であっても、全結合部位を含む場合よりは低い親和性ではあるものの、抗原を認識し、結合する能力を有していることが知られている。従って、本発明における抗体断片はFv断片が好ましいが、これに限定されるものではなく、重鎖または軽鎖のCDRが保存され抗原を認識し、結合する能力を有する抗体の断片を含むポリペプチドであってよい。

また、Fab断片 (F(ab)とも呼ばれる) はさらに、軽鎖の定常領域および重鎖の定常領域(CH1)を含む。例えば抗体のパパイン消化により、Fab断片と呼ばれる、1つの抗原結合部位を形成する重鎖および軽鎖の可変領域を含む抗原結合断片、及び、残りの容易に結晶化するために「Fc」と呼ばれる断片が生じる。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域の1またはそれ以上のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端由来の数個の残基を付加的に有する点でFab断片と異なるが、1つの抗原結合部位を形成する重鎖および軽鎖の可変領域を含む抗原結合断片である点で構造的にFabと同等である。本発明においては、プロテアーゼによる消化で生成した抗体断片と同一でなくとも、パパイン消化により得られるものと同等な、1つの抗原結合部位を形成する重鎖および軽鎖の可変領域を含む抗原結合断片をFab様抗体と称する。Fab' -SHとは、定常領域の1またはそれ以上のシステイン残基が遊離の

チオール基を有するFab'を示すものである。F(ab')断片は、F(ab')₂のヒンジ部のシステインにおけるジスルフィド結合の切断により製造される。化学的に結合されたその他の抗体断片も当業者には知られている。抗体をペプシンで消化すると、2つの抗原結合部位を有し、抗原を交差結合し得るF(ab')₂断片、及び、残りの別な断片(pFc' と呼ばれる)が得られる。本発明において、ペプシン消化により得られるのも同等な、2つの抗原結合部位を有し抗原を交差結合し得る抗体断片をF(ab')₂様抗体と称する。例えば、これらの抗体断片は組換技術により製造することも可能である。例えば、上述の抗体ファージライブライアから抗体断片を単離することもできる。また、大腸菌等の宿主より直接F(ab')₂-SH断片を回収し、F(ab')₂断片の形態に化学的結合させることもできる(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。さらにまた別の方法としては、F(ab')₂断片を直接、組換宿主培養物から単離することもできる。

さらに、本発明で使用される抗体は多特異性抗体であってもよい。多特異性抗体は、少なくとも2種類の異なる抗原に対して特異性を有する抗体である。通常このような分子は2個の抗原を結合するものであるが(即ち、二重特異性抗体(bispecific antibody))、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上(例えば、3種類)の抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。多特異性抗体は全長からなる抗体、またはそのような抗体の断片(例えば、F(ab')₂、二特異性抗体)であり得る。二重特異性抗体は2種類の抗体の重鎖と軽鎖(HL対)を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製し、得ることもできる(Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983))。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体を作製することも可能である。具体的には、結合特異性を有する抗体の可変領域を免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合する。該定常ドメイン配列は、好ましくは免疫グロブリンの重鎖の定常領域の内、ヒンジ、CH2及びCH3領域の一部を少なくとも含むものである。好ましくは、さらに軽鎖との結合に必

要な重鎖のCH1領域が含まれる。免疫グロブリン重鎖融合体をコードするDNA、及び、所望により免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAをそれぞれ別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に形質転換する。別々の発現ベクターに各遺伝子を挿入することにより、それぞれの鎖の存在割合が同じでない方が、得られる抗体の収量が上がる場合に、各鎖の発現割合の調節が可能となり都合が良いが、当然ながら、複数の鎖をコードする遺伝子を一つのベクターに挿入して用いることも可能である。

ダイアボディ (diabody; Db) は、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片を指す (P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404, 097号、W093/11161号等)。一般にダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域(V_L)及び重鎖可変領域(V_H)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされる V_L と V_H とは、その間のリンカーが短いため単鎖V領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。このとき2つの異なる抗原(a、b)に対する V_L と V_H を V_La-V_Hb と V_Lb-V_Ha の組合せで5残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二種特異性Dbとして分泌される。本発明の抗体としては、このようなDbであってもよい。

一本鎖抗体 (scFvとも記載する) は、抗体の重鎖V領域と軽鎖V領域とを連結することにより得られる。scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol. 113 (Rosenburg及びMoore編、Springer Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)) 参照。一本鎖抗体を作成する方法は当技術分野において周知である(例えば、米国特許第4,946,778号、米国特許第5,260,203号、米国特許第5,091,513号、米国特許第5,455,030号等を参照)。このscFvにおいて、重鎖V領域と軽鎖V領域は、リンカー、好ましくはポリペプチドリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 587

9-5883)。scFvにおける重鎖V領域および軽鎖V領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えば12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。scFvをコードするDNAは、前記抗体の重鎖または重鎖V領域をコードするDNA、および軽鎖または軽鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらの抗体も含まれる。

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)が、これらに限定されるものではない。クロマトグラフィーとしては、アフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾

過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティーコロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

本発明は、本発明の抗体を含む、PCIの活性の阻害剤を提供する。また本発明は、本発明の抗体の、PCIの活性の阻害のための使用に関する。また本発明は、本発明の抗体とPCIとを接触させる工程を含む、PCIの活性を阻害する方法に関する。本発明の抗体をPCIと接触させることにより、PCIによるaPC生成の阻害および/またはPCIによるaPC活性の阻害を抑制することができる。また本発明は、本発明の抗体を含む、aPCの生成および/または活性の増強剤を提供する。また本発明は、本発明の抗体の、aPCの生成および/または活性の増強のための使用に関する。本発明の抗体をPCIと接触させる工程により、PCIの阻害を通して、内在性または外来のPCの活性化の低下および/またはaPC活性の低下を抑制することが可能である。本発明の抗体を投与する場合、抗体は単独で投与することも可能であり、また、PCおよび/またはaPCと併用することも可能である。

aPCは血液凝固および炎症を抑制する作用が知られており、本発明のPCI中和抗体を投与する工程により、血液凝固または炎症を抑制するaPCの効果を高めることが可能となる。本発明は、本発明の抗体を投与する工程を含む、血液凝固または炎症を抑制する方法に関する。該方法においては、さらにPCおよび/またはaPCを投与する工程を含んでもよい。この場合、PCおよび/またはaPCと本発明の抗体とを予め混合しておき、それを投与することができるし、別々に投与してもよい。本発明の抗体を有効成分として含有する医薬製剤を用いることにより、aPCによる処置（例えば血栓症および敗血症等の予防および治療）におけるaPCの効果をより

高めることが可能となる。なお本発明の抗体を「有効成分として含有する」とは、本発明の抗体を活性成分の少なくとも1つとして含むという意味であり、本発明の抗体の含有率を制限するものではない。本発明の抗体は、活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/または進展する疾患の予防または治療に有用であり、その中でも血液凝固反応の亢進および/または炎症反応の亢進によって惹起される疾患の予防および/または治療に特に有効である。そのような疾患としては、具体的には例えば動脈血栓症、静脈血栓症、播種性血管内凝固 (Disseminated Intravascular Coagulation; DIC) 症候群、敗血症等が挙げられる。

また本発明は、(a) 本発明の抗体、および(b) PCおよび/またはaPCを含むキットを提供する。このキットは、活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/または進展する疾患の予防または治療に使用することができる。さらに本発明は、活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/または進展する疾患の予防または治療に使用されるキットであって、(a) PC、aPC、および本発明の抗体からなる群から選択される少なくとも一つ、および(b) 治療有効量のPCおよび/またはaPCと該抗体とを併用することの記載または該記載へのリンクを含む記録媒体、を含むキットを提供する。このような疾患としては、上記のように血液凝固反応の亢進および/または炎症反応の亢進によって惹起される疾患が挙げられ、具体的には動脈血栓症、静脈血栓症、DIC、敗血症等が含まれる。本キットは、内因的aPCあるいは生体外から投与したPCまたはaPCの体内における活性を相対的に上昇させるために有用であり、これにより上記疾患の予防および治療を行うことができる。記録媒体としては、紙およびプラスチックなどの印刷媒体、フレキシブルディスク (FD)、コンパクトディスク (CD)、デジタルリビデオディスク (DVD)、半導体メモリ等のコンピュータ読み取り可能な記録媒体など所望の記録媒体が挙げられる。典型的には、キットに添付される指示書などが挙げられ、そこに治療有効量のPCおよび/またはaPCと本発明の抗体

とを併用することが記載されているものであってよい。リンクとは、直接には治療有効量のPCおよび/またはaPCと該抗体とを併用することは記載されていないが、印などによって該記載と関連付けられていることを言い、その印を通して該記載にたどり着ける場合である。例えば指示書には別紙またはURLなどを参照するように指示または示唆する記載があり、別紙またはURLに該記載がある場合などが含まれる。このようなリンクは、3回までの参照（リンクの深さが3以内）で該記載までたどり着けることが好ましく、より好ましくは2回の参照（リンクの深さが2）、より好ましくは1回の参照（リンクの深さが1）である。

本発明の抗体は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001～100000 mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗体はこれらの投与量に制限されるものではない。

本発明の抗体は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体および/または添加物を供に含むものであってよい。例えば界面活性剤（PEG、Tween等）、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、キレート剤（EDTA等）、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用することができる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナ

トリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスター、無機塩類等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸を含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えは生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えは、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えはアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、PEG等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80、HCO-50）等と併用してもよい。

また、必要に応じ本発明の抗体をマイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル）に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム（リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等）とすることもできる（"Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)等参照）。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の抗体に適用し得る（Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982); 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP第133,988号）。

また、本発明の抗体をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、nakedプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、HVJベクター等の各種ウイルスベクターとし

て形成するか (Adolph 『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florid (1996) 参照) 、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆 (WO93/17706 等) して投与することができる。しかしながら、生体内において抗体が発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路 (静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法 (電子銃等による) 、添鼻薬等粘膜経路を介する方法等) により十分な量が投与される。ex vivoにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法 (米国特許第4,945,050号) 、またはウイルス感染を利用して細胞に投与し、該細胞を動物に再導入することにより本発明の抗体をコードする遺伝子を投与してもよい。

図面の簡単な説明

図 1 は、PCI cDNA の塩基配列 (タグなし) を示す図である。全長 PCI 遺伝子の塩基配列を示した。動物細胞用発現ベクター (pCHOI) の EcoRI-BamHI 間に挿入する目的で 5' 末端および 3' 末端にそれぞれ EcoRI および BamHI 認識配列 (下線) を、さらに転写効率を上げるために開始コドンの手前に Kozak 配列を付加してある。塩基配列を配列番号 : 4、アミノ酸配列を配列番号 : 5 とした。

図 2 は、PCI cDNA の塩基配列 (FLAG タグ付き) を示す図である。Flag タグ付きの PCI 遺伝子の塩基配列を示した。動物細胞用発現ベクター (pCHO2-FLAG) の EcoRI-BamHI 間に全長 PCI をコードする cDNA を挿入することにより、全長 PCI 遺伝子の 3' 側に Flag 配列 (波線) を付加した。塩基配列を配列番号 : 6、アミノ酸配列を配列番号 : 7 とした。

図 3 は、PCI-Flag および PCI の SDS-PAGE とウェスタンプロッティングによる分析結果を示す写真である。(A) PCI-Flag (レーン 1 および 2) 、または (B) タグなしの PCI (レーン 3 および 4) を SDS-PAGE により分離し、クマシーブルー染色 (レーン 1 および 3) または抗 PCI 抗体を用いたウェスタンプロッティング (レーン 2 および 4)

)により検出した。

図4は、各抗PCI抗体のaPC/PCIおよびThr/TM/PCIアッセイにおける中和活性の比較を示す図である。白い円はaPC/PCIアッセイ、黒い円はThr/TM/PCIアッセイの結果を表す。PCI非添加時を100%とし、PCI添加で抗体非添加時を0%とした時の相対値で示した。

図5は、各抗PCI中和抗体のH鎖のアミノ酸配列を示す図である。CDR1、2および3を囲みで示した。図中のアミノ酸配列は上から順に配列番号：8～14とした。

図6は、各抗PCI中和抗体のL鎖のアミノ酸配列を示す図である。CDR1、2および3を囲みで示した。図中のアミノ酸配列は上から順に配列番号：15～21とした。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書に引用された文献は、全て本明細書の一部として組み込まれる。

[実施例1] PCI発現ベクターの構築

1.1 PCI遺伝子のクローニング

全長PCI遺伝子のクローニングは以下のプライマーを用いたPCR法によって行った。

PCI-up: 5'-ACG AAT TCC ACC ATG CAG CTC TTC CTC (配列番号：1)

PCI-low: 5'-CTG GAT CCT CAG GGG CGG TTC ACT TTG C (配列番号：2)

Human kidney marathon ready cDNA (Clontech) を鑄型にして上記プライマーによりPCRを行い、5'末端にEcoRI配列、3'末端にBamHI配列を持つ全ORFを含むヒトPCI遺伝子を増幅した。増幅されたDNA断片を EcoRIとBamHIで消化し、動物細胞発現ベクターであるpCHOIのEcoRIとBamHI切断部位に挿入した。ベクター中のPCI遺伝子について塩基配列を解析し、正しい配列を有したプラスミドを選別することでpCHOI-PCIベクター構築を完了した。（図1）

また、Flagタグ付きPCI (PCI-Flag) 発現ベクターの構築は以下のとおり行った。pCHOI-PCIベクターを鑄型にして、PCI-up及びPCI-low2プライマーを用いてPCRを行いPCI遺伝子の増幅を行った。

PCI-low2: 5' - TTG GAT CCG GGG TTC ACT TTG CCA AG (配列番号: 3)

このDNA断片を EcoRI と BamHI で消化し、クローニングサイトの直後にFlagタグを持つ動物細胞発現ベクターpCHOII-FlagのEcoRIとBamHI切断部位に挿入した。塩基配列を確認し、pCHOII-PCI-Flagの構築を完了した。 (図 2)

1.2 PCIおよびPCI-Flag産生細胞株の樹立

pCHOI-PCI、pCHOII-PCI-FlagをそれぞれPvuIで切断し、直鎖化を行った。このDNA 30 μgをCHO細胞 (DXB11株) にエレクトロポレーション法により導入した。その後、細胞を5 % FBS (GIBCO BRL CAT#10099-141) を添加した α (-) MEM (核酸未含有) (GIBCO BRL CAT# 12561-056) で培養し、PCIあるいはPCI-Flag産生株の選抜を行った。この段階で得られた細胞株を、終濃度50 nMとなるようにMTXを加えた同培地で培養し、高産生細胞株を樹立した。PCIおよびPCI-Flagの発現は抗PCI抗体 (Affinity Biologicals CAT#GAPCI-IG) を用いて確認した。

[実施例 2] PCI-Flagの精製

PCI-Flag高発現CHO株を、ローラーボトル (1700 cm²) を用いて、5 % FBSを添加した α (-) MEM (核酸未含有) 培地中で培養を行った。細胞がコンフルエントになるまで培養 (37°C、0.5 rpm) した後、培地除去およびPBSによる洗浄を行い、CHO-S-SFMII培地 (GIBCO BRL CAT#12052-098) を添加し72時間培養した。得られた培養上清は、遠心分離により細胞破碎物を除去後、0.45 μm フィルターによりろ過して以下の精製に用いた。培養上清を0.05% Tween20を含む50 mM トリス緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したCM sepharose Fast Flow カラム (Amersham CAT# 17-0719-01) に添加し、洗浄後、400 mM NaClを含む同緩衝液により溶出した。溶出画分をNaCl濃度が200 mMとなるよう希釈し、150 mM NaClと0.05% Tween20を含む50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したAnti-Flag M2 agarose affinity gel カラム (SIGMA CA

T#A-2220) に添加した。溶出は0.05% Tween20を含む100 mM グリシン緩衝液 (pH3.5)により行い、溶出画分は1 M トリス緩衝液(pH8.0)にて、直ちに中和した。次に、PCI-Flagを含む画分を0.05% Tween20を含む50 mM リン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したCM sepharose Fast Flowカラムに添加後、400 mMのNaClを含む同緩衝液で溶出を行うことにより溶媒置換を行った。さらにCentricon YM-3 (Amicon) による限外ろ過濃縮を行い、PCI-Flagを調製した。精製タンパクはSDS-PAGEにより分離したのち、クマシ一染色、およびPVDF膜へ転写し、抗PCI抗体によるウエスタン解析により確認した。(図3A)

[実施例3] PCIの精製

PCI高発現CHO株を、上記同様の方法にてローラーボトル (1700 cm²) を用い、培養上清を調製した。培養上清を0.05% Tween20を含む50 mM トリス緩衝液(pH7.0)で平衡化したCM sepharose Fast Flowに添加し、洗浄後、400 mM NaClを含む同緩衝液により溶出した。次に、PCIを含む画分を0.05% Tween20を含む10 mM リン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したHiTrap Heparin HP (Amersham CAT# 17-0407-01) カラムに添加し、段階的にNaCl濃度 (0 mMから1000 mM) を上昇させることにより溶出を行った。溶出画分をSuperdex 200 26/60カラム (Amersham CAT# 17-1071-01) に添加し、分子量に従って分画した。溶媒には0.01% Tween 20を含むPBS (PBS-T) を用いた。これを2回繰り返し、PCIを精製した。精製タンパクはSDS-PAGEにより分離したのち、クマシ一染色およびPVDF膜へ転写し抗PCI抗体によるウエスタン解析で確認した。(図3B)

[実施例4] PCIに対する中和活性を持つ抗PCI抗体の作製

4.1 免疫及びハイブリドーマの作製

PCI-Flagを免疫抗原として、Balb/cマウス (雌、13週齢、日本チャールズリバ一) 5匹に定法に従い免疫を行った。初回免疫には抗原を100 μg/headとなるよう調製し、FCA {フロイント完全アジュバント (H37 Ra)、Difco (3113-60) ベクトンディックキンソン (cat#231131) } を用いてエマルジョン化したものを皮下に

投与し、2週間後に $50 \mu\text{g}/\text{head}$ となるように調製したものをFIA {フロイント不完全アジュバント、Difco (0639-60)、ベクトンディッキンソン (cat#263910) } でエマルジョン化したものを皮下に投与した。以降、2週間間隔で追加免疫を合計5回行い、最終免疫については $50 \mu\text{g}/\text{head}$ となるようにPBSに希釈し尾静脈内または皮下に投与した。PCIを $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, $100 \mu\text{l}/\text{well}$ でコートしたイムノプレートを用いたELISAによりPCIに対する血清中の抗体価が上昇しているのを確認後、No. 2マウスは尾静脈内、No. 4マウスは皮下に最終免疫を施し、定法に従い、マウスミエローマ細胞P3U1とマウス脾臓細胞を混合し、PEG1500 (ロシュ・ダイアグノスティック、cat#783 641) により細胞融合を行った。それぞれマウス由来のハイブリドーマは96穴培養プレート16枚ずつ培養した。フュージョン翌日よりHAT培地 {10% FBS / RPMI1640 / 1 x HAT media supplement (SIGMA CAT# H-0262) / 4% BM-Condimed H1 Hybridoma cloning supplement (Roche CAT# 1088947)} で選択を開始し、フュージョン後10日目に培養上清を回収しELISAスクリーニングを行った。ELISAスクリーニングは前述の抗体価測定と同様にPCIを $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, $100 \mu\text{l}/\text{well}$ でコートしたイムノプレートを用いて行った。

4.2 スクリーニング

4.2.1 ELISA

PCIを用いたELISAスクリーニングにより陽性ウェルを選択した。選択した陽性ウェルは24ウェルプレートに拡大した後、限界希釈法 (1陽性ウェルの細胞100個を96ウェルプレート1枚に播き込む) によりクローニングした。クローニングしたハイブリドーマを拡大培養し、培養上清から抗体の精製を行った。290個の陽性ウェルを選択し24ウェルプレートに拡大した後、1次スクリーニングでOD値の高かつた方から111個を選び、限界希釈法によりクローニングを行った。限界希釈を行わなかった179個は培養上清を回収し、細胞の保存のみを行った。111個の限界希釈を行ったウェルから最終的に抗体を安定に産生する81クローンを樹立した。

4.2.2 aPC/PCIアッセイ

aPC/PCIアッセイによるPCIに対する中和活性の測定法は、反応液 (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.1% BSA, 5 U/ml Heparin) にハイブリドーマの培養上清または精製抗体、及び5 μg/ml PCIを添加して37°C、30分加温した。0.25 μg/ml aPCを添加してさらに37°C、30分加温した。0.4 mM Spectrozyme aPC (American Diagnostica Inc.) を添加し室温で2時間反応させた後、405 nmで比色した。（以上、表示濃度はすべて最終濃度）。単一クローン化したハイブリドーマの培養上清81検体について、aPC/PCIアッセイを行い、PCI活性が中和されることによりaPC活性が回復されるクローンの選抜を行った。PCIに対する中和活性が強かったクローンから順番に16クローンを選択し、培養上清からProtein Gカラムにて抗体の精製を行った。精製した抗体を用いて、aPC/PCIアッセイを行ったところ、16クローン中8クローンに抗体の用量に依存した強い中和活性が確認された。これらのうち7クローンの用量依存曲線を図4に示した。

4.2.3 Thrombin(Thr)/Thrombomodulin(TM)/PCIアッセイ

Thrombin(Thr)/Thrombomodulin(TM)/PCIアッセイによるPCIに対する中和活性の測定法は、反応液 (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.1% BSA, 5 U/ml Heparin) に精製抗体、5 μg/ml PCI、2 nM Thr、10 nM TMを添加して37°C、30分加温した。0.73 μg/ml PCを添加してさらに37°C、50分加温した後、0.875 μg/ml argathrobanを加えて反応を停止した。0.4 mM Spectrozyme aPCを添加し室温で2時間反応させた後、405 nmで比色した。（以上、表示濃度はすべて最終濃度）。

精製した抗体でaPC/PCIアッセイにて中和活性が確認された7クローンについてThr/TM/PCIアッセイを行った。その結果、7クローン中3クローン (PC31E2、PC31F1、およびPC30G1) について用量に依存した強い中和活性が確認された（図4）。

4.3 抗体精製

アイソタイプがIgG1、IgG2a、IgG2bであった抗体は、それぞれハイブリドーマ培養上清を20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化したHi Trap Protein G HP (Am

ershaw CAT# 17-0404-01) に添加し、洗浄後、0.1 M グリシン緩衝液 (pH2.7) で溶出することにより精製した。溶出画分は1 M トリス緩衝液 (pH9.0) で直ちに中和を行った。抗体を含む画分をプールした後、0.05% Tween20を含むPBSで一昼夜、透析を行い溶媒置換後、0.02%となるようにNaN₃を添加した。

4.4 抗PCI抗体のアイソタイプ解析

抗PCI抗体のアイソタイプングは、ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit II (PIERCE CAT# 37502) を用い、方法は添付のマニュアルに従った。樹立した抗PCI抗体81クローンについてアイソタイプ解析をしたところ、IgG1が70クローン、IgG2aが6クローン、IgG2bが4クローン、IgMが1クローンであった。

4.5 BIACOREによる抗PCI抗体の速度論的解析

10 mM 酢酸ナトリウム (pH5.0) で25 μg/mlに希釈したPCI-Flagを用いて、アミンカップリングキット (BIACORE社、BR-1000-50) に記載された方法にて、センサーチップCM5 (BIACORE社、BR-1000-14) にアミンカップリングした。この操作にて約3000 RUのPCI-Flagが、CM5チップ上に固定化された。このセンサーチップを用いてBIACORE2000により以下の速度論的解析を行った。各抗PCI抗体をHBS-EP 緩衝液 (BIACORE社、BR-1001-88) にて希釈して、1.25、2.5、5、10、20 μg/mlになるように調製した。チップをHBS-EP 緩衝液で平衡化後、流速20 μl/minにて各濃度の抗体40 μlを添加した。抗体を添加中の2分間を結合相とし、その後HBS-EP 緩衝液に切り換え、2分間を解離相とした。解離相終了後、40 μlの10 mM 塩酸、及び40 μlの0.05% SDSを連続して添加することにより、センサーチップを再生した。この操作により得られたセンサーグラムを重ね書きし、データ解析用ソフト (BIAevaluation, ver. 3.0) にて結合速度定数 (ka) 、解離速度定数 (kd) 、解離定数 (KD) 、最大結合量 (R_{max}) を算出した。

精製抗体を用いたaPC/PCIアッセイにてPCIに対する強い中和活性の認められた8つのクローンについてBIACOREによる速度論的解析を行った結果、解離定数が10⁻⁹ ~10⁻¹⁰ Mで比較的高親和性の抗体が多く含まれていることが明らかとなつた。表

1に得られたクローンの抗PCI抗体の性質をまとめた。

表1 中和抗体の性質

クローン	アイソタイプ	aPC/PCI	Thr/TM/PCI (+H)	カイネティックパラメータ		
				ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
PC19G8	IgG1	+	—	1.68E+05	2.13E-05	0.126
PC23A7	IgG2a	+	—	1.51E+05	7.17E-05	0.473
PC23D8	IgG2a	+	—	2.25E+05	6.59E-05	0.293
PC30G1	IgG1	+	+	1.82E+05	4.54E-05	0.249
PC31E2	IgG1	+	+	1.75E+05	3.13E-04	1.79
PC31F1	IgG1	+	+	1.53E+05	3.89E-05	0.254
PC39C6	IgG1	+	—	8.88E+04	4.89E-04	5.51

[実施例5] 抗PCI中和抗体のH鎖及びL鎖の解析

各抗体を産生するハイブリドーマ約 1×10^7 個の細胞よりRNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN、Cat. No. 74904) を用いてtotal RNAの抽出を行った。SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech、Cat. No. K1811-1)を用いて、total RNAからcDNAの合成を行った。PC19G8、PC30G1、PC31E2、PC31F1、PC39C6はIgG1の定常領域特異的なプライマー、またPC23A7、PC23D8はIgG2aの定常領域特異的なプライマーを用いてAdvantage2 PCR Kitにて5'-RACEによるPCRを行い、H鎖及びL鎖の増幅を行った。増幅されたH鎖及びL鎖のDNA断片はpGEM-T easy vector (Promega、Cat. No. A1360)を用いてクローニングし、塩基配列の決定を行った。

得られた塩基配列を解析した結果、H鎖及びL鎖の可変領域のアミノ酸配列はそれぞれ図5及び6に示したようになった。PC19G8、PC23D8はアミノ酸配列が一致したことから、同一クローン由来の抗体であることが予測された。ただし、Isotypeは、PC19G8はIgG1でPC23D8はIgG2aだったので、クラススイッチが起きたと考えられた。PC23A7及びPC39C6は上記2クローンの抗体に類似した配列を有してお

り、これら4クローンの抗体のエピトープが近傍にあることが予測された。一方、PC30G1とPC31F1の配列は、前述の4クローンの抗体との類似性は低かったが、これら2クローンは類似の配列を有していたのでお互いのエピトープは近いことが予測された。PC31E2の配列に関しては他の6クローンとは類似性が低いことが明らかとなった。PC19G8、PC23A7、PC23D8、PC39C6はaPC-PCI系のみ、またPC30G1、PC31E2、PC31F1はaPC-PCI系及びThr-TM-PCI系の両方を抑制することから、配列上のグループ分けがPCIに対する中和活性の様式にほぼ反映していることが推察された。

産業上の利用の可能性

本発明により、PCIに対し中和作用を有する抗PCI抗体が提供された。本発明の抗体は、aPCの生成および酵素活性を阻害するPCIに対して、その活性を阻害するように働くことを通してaPCの活性を維持し、血液凝固系の活性化の抑制または抗炎症作用などのaPCの生理活性の効果を持続させる働きを有する。本発明の抗体は、活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および/または進展する疾患または傷害の予防または治療に用いることができ、特に血栓症および敗血症などのaPCによる予防および治療において有用である。

請求の範囲

1. 抗PCI抗体であって、(a) 活性化プロテインC (aPC) 活性に対するプロテインCインヒビター (PCI) の阻害作用を阻害する活性、または(b) トロンビン/トロンボモデュリン (Thr/TM) 複合体による活性化プロテインC (aPC) 生成に対するプロテインCインヒビター (PCI) の阻害作用を阻害する活性、の少なくともいずれかを有する抗体。
2. 抗PCI抗体であって、(a) 活性化プロテインC (aPC) 活性に対するプロテインCインヒビター (PCI) の阻害作用を阻害する活性、および(b) トロンビン/トロンボモデュリン (Thr/TM) 複合体による活性化プロテインC (aPC) 生成に対するプロテインCインヒビター (PCI) の阻害作用を阻害する活性、の両方を有する抗体。
3. PC19G8、PC23A7、PC23D8、PC30G1、PC31E2、PC31F1、およびPC39C6 からなる群より選択される抗体の可変領域を含む抗体と、抗体認識部位が競合する、請求項1または2に記載の抗体。
4. 請求項1または2に記載の抗体であって、以下の(a)から(f)のいずれかのアミノ酸配列からなる相補性決定領域またはこれと機能的に同等の相補性決定領域を有する抗体。
 - (a) 配列番号：49、50、および51に記載のアミノ酸配列。
 - (b) 配列番号：55、56、および57に記載のアミノ酸配列。
 - (c) 配列番号：52、53、54およびに記載のアミノ酸配列。
 - (d) 配列番号：58、59、60およびに記載のアミノ酸配列。
 - (e) 配列番号：25、31、および36に記載のアミノ酸配列。
 - (f) 配列番号：41、45、および48に記載のアミノ酸配列。
5. 抗体がヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体断片、一本鎖抗体、およびダイアボディーからなる群より選択される、請求項1または2に記載の抗体。

6. 請求項 1 または 2 に記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物。
7. さらにプロテインCおよび／または活性化プロテインCを含む、請求項 6 に記載の組成物。
8. 活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および／または進展する疾患の予防または治療に用いられる医薬組成物である、請求項 6 に記載の組成物。
9. 疾患が血液凝固反応の亢進および／または炎症反応の亢進によって惹起される疾患である請求項 8 に記載の組成物。
10. 血液凝固反応の亢進および／または炎症反応の亢進によって惹起される疾患が、敗血症、播種性血管内凝固症候群、動脈血栓症、および静脈血栓症からなる群より選択される、請求項 9 に記載の組成物。
11. 活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および／または進展する疾患を予防または治療する方法であって、(a) プロテインCおよび／または活性化プロテインC、並びに (b) 請求項 1 または 2 に記載の抗体、を投与する工程を含む方法。
12. 活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および／または進展する疾患を予防または治療する方法であって、請求項 1 または 2 に記載の抗体を投与する工程を含む方法。
13. 活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および／または進展する疾患の予防または治療に使用されるキットであって、(a) 請求項 1 または 2 に記載の抗体、および (b) プロテインC、活性化プロテインC、またはその両方、を含むキット。
14. 活性化プロテインCの活性の低下ないしは不足によって発症および／または進展する疾患の予防または治療に使用されるキットであって、(a) プロテインC、活性化プロテインC、および請求項 1 または 2 に記載の抗体、および (b) (

i) 治療有効量のプロテインCおよび／または活性化プロテインC、並びに(ii)該抗体、を併用することの記載または該記載へのリンクを含む記録媒体、を含むキット。

図 1

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAATTCCACCATGCAGCTTCTCCTCTGTGCCTGGTGCCTCTCAGCCCTCAGGGGCTCCCTCACCGCACCACCCCCGGAGATGAAGAAGAGA									
M	Q	L	F	L	L	C	V	L	S
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GTCGAGGACCTCCATGTAGGTGCCACGGTGGCCCCAGCAGCAGAAGGGACTTACCTTCGACCTCTACAGGTCTGGCTCCGCTGCCAGCCAGA									
V	E	D	L	H	V	G	A	T	V
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ATATCTCTCTCCCTGTGAGCATCTCATGAGCCTGGCCATGCTCTCCCTGGGGCTGGGTCCAGCACAAAGATGCAGATCTGGAGGGCTGGCCCT									
I	F	F	S	P	V	S	I	S	M
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CAACCTCCAGAAAAGCTCAGAGGAGGAGCTGCACAGAGGCTTCAGCAGCTCCTCAGGAACCTAACCCAGCCCAGAGATGGCTCCAGCTGAGCCTCGGC									
N	L	Q	K	S	S	E	E	L	H
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
AATGCCCTTTCACCGACCTGGTAGACCTGCAGGACACCTTCGTAAGTGCATGAAGACCGCTGTACCTGGCAGACACTTCCCCACCAACTTAGGG									
N	A	L	F	T	D	L	V	V	D
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
ACTCTGCAGGGGCCATGAACCAGATCAATGATTATGTGGAAAGCAACGAAGGGCAAGATTGTGACTTGCTTAAGAACCTCGATAGCAATGCGTCGT									
S	A	G	A	M	K	Q	I	N	D
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
GATCATGGTAATTACATCTCTTAAAGCTAAAGCTAAGTGGAGACAAGCTCAACCACAAAGGCACCCAAGAGCAAGACTTACGTGACCTCGGAGACTGTG									
I	M	V	N	Y	I	F	F	K	A
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
GTGCGGGTACCCATGATGAGGCCGAGGATCAGTATCACTACCTCTGGACCGAACCTCTCTGCAGGGTGGGGGTCCCTACCAAGGCAATGCCA									
V	R	V	P	M	M	S	R	E	D
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
CGGCTTGTTCATTCTCCCACGTGAGGAAAGATGCAGCAGGTGGAGAATGGACTGAGTGGAGAAAACGCTGAGGAAGTGGCTTAAGATGTTAAAAAGAG									
A	L	F	I	L	P	S	E	G	K
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
GCAGCTGAGCTTACCTTCCAAATTCTCATTGAGGGCTCTATCAGTGGAGAAAGTCCTCCCCAGTCTGGGGATCAGTAACGTCTCACCTCCAT									
Q	L	E	L	Y	L	P	K	F	S
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
GCTGATCTGTCGGCATCAGCAACCACTCAAATATCCAGGTGTCAGATGGTGACAAAGCTGTGGAGGTGGACGAGTCGGAACCCAGAGCAGCGG									
A	D	L	S	G	I	S	N	H	S
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
CAGCCACGGGACAATTCACTTCAAGTCGGCCCGCTGAACCTCTCAGAGGCTAGTGTCAACAGGCCCTTCTGATGTTATTGTGGATAACACAT									
A	T	G	T	I	F	T	R	S	A
1210	1220	1230	1240						
CCTCTTCTGGCAAAGTGAACGCCCTGAGGATCC									
L	F	L	G	K	V	N	R	P	*

2 / 6

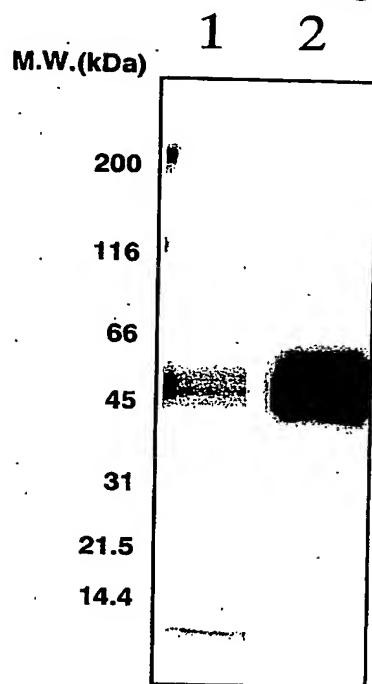
图 2

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAATTCCACCATGCAGCTTCCTCCTTGTGCCTGGTCTCAGCCCTCAGGGGCCTCCCTCACCGCCACCAACGGGGAGATGAAGAAGAGA									
M	O	L	F	L	L	C	V	L	L
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GTCGAGGACCTCCATGTAGGTGCCACGGTGGCCCCAGCAGCAGAAGGGACTTACCTTCGACCTCACAGGGCTTGGCTCGCTGCCAGCCAGA									
V	E	D	L	H	V	G	A	T	V
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ATATCTCTCTCCCTGTGAGCATCTCCATGAGCTGGCCATGCTCCCTGGGGCTGGGTCCAGCACAAAGATGCAGATCTGGAGGGCTGGCCCT									
I	F	F	S	P	V	S	I	S	M
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CAACCTCCAGAAAAGCTCAGAGGAGGAGCTGCACAGAGGTTTCAGCAGCTCCCTCAGGAACCTCACCAACAGCCCAGAGATGGCTCCAGCTGAGCCTCGGC									
N	L	Q	K	S	S	E	E	L	H
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
AATGCCCTTTACCGACCTGGTAGACCTGCAGGACACCTCGTAAGTGCATGAAGACGCTGTACCTGGCAGACACTTCCCCACCAACTTAGGG									
N	A	L	F	T	D	L	V	V	D
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
ACTCTGCAGGGCCATGAAGCAGATCAATGATTATGTGGCAAAGCAACGAAGGGCAAGATTGTGGACTTGCTTAAGAACCTCGATAGCAATGCGCTCGT									
S	A	G	A	M	K	Q	I	N	D
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
GATCATGGTGAATTACATCTCTTAAAGCTAAGTGGAGACAAGCTCAACCACAAAGGCACCCAAAGGCAAGAGACTTCTACGTGACCTCGGAGACTGTG									
I	M	V	N	Y	I	F	F	K	A
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
GTGCGGGTACCCATGATGAGCCGCGAGGATCACTACACTACCTGGACCGAACCTCTCCTGCAGGGTGGGGTCCCTACCAAGGCAATGCCA									
V	R	V	P	M	M	S	R	E	D
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
CGGCTTTGTTATTCTCCCCAGTGAGGGAAAGATGCAGCAGGTGGAGAATGGACTGAGTGAGAAAACGCTGAGGAAGTGGCTTAAGATGTTAAAAAGAG									
A	L	F	I	L	P	S	E	G	K
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
GCAGCTCGAGCTTACCTCCCAAATTCTCCATTGAGGGCTCTATCAGCTGGAGAAAGTCTCCCTGGGATCAGTAACGTCTCACCTCCCAT									
Q	L	E	L	Y	L	P	K	F	S
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
GCTGATCTGTCGGCATCAGCAACCCTCAAAATATCCAGGTGCTGAGATGGTCACAAAGCTGTGGGGAGGTGGACGAGTCGGAAACAGAGCAGCGG									
A	D	L	S	G	I	S	N	H	S
1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
CAGCCACGGGGACAATATTCACTTCAGGTGGCCGGCTGAACCTCAGAGGCTAGTGTCAACAGGCCCTTCTGATGTTATTGTGGATAACACAT									
A	T	G	T	I	F	T	R	S	A
1210	1220	1230	1240	1250	1260				
CCTCTTCTGGCAAAGTGAACCGCCGGATCCGACTACAAGGACGAGCATGACAAGTGA									
L	F	L	G	K	V	N	R	P	G
S D Y K D D D K *									

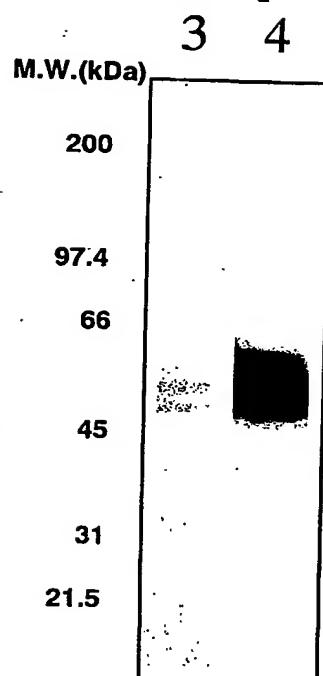
3 / 6

図 3

A [PCI-Flag]



B [PCI]



BEST AVAILABLE COPY

4 / 6

図 4

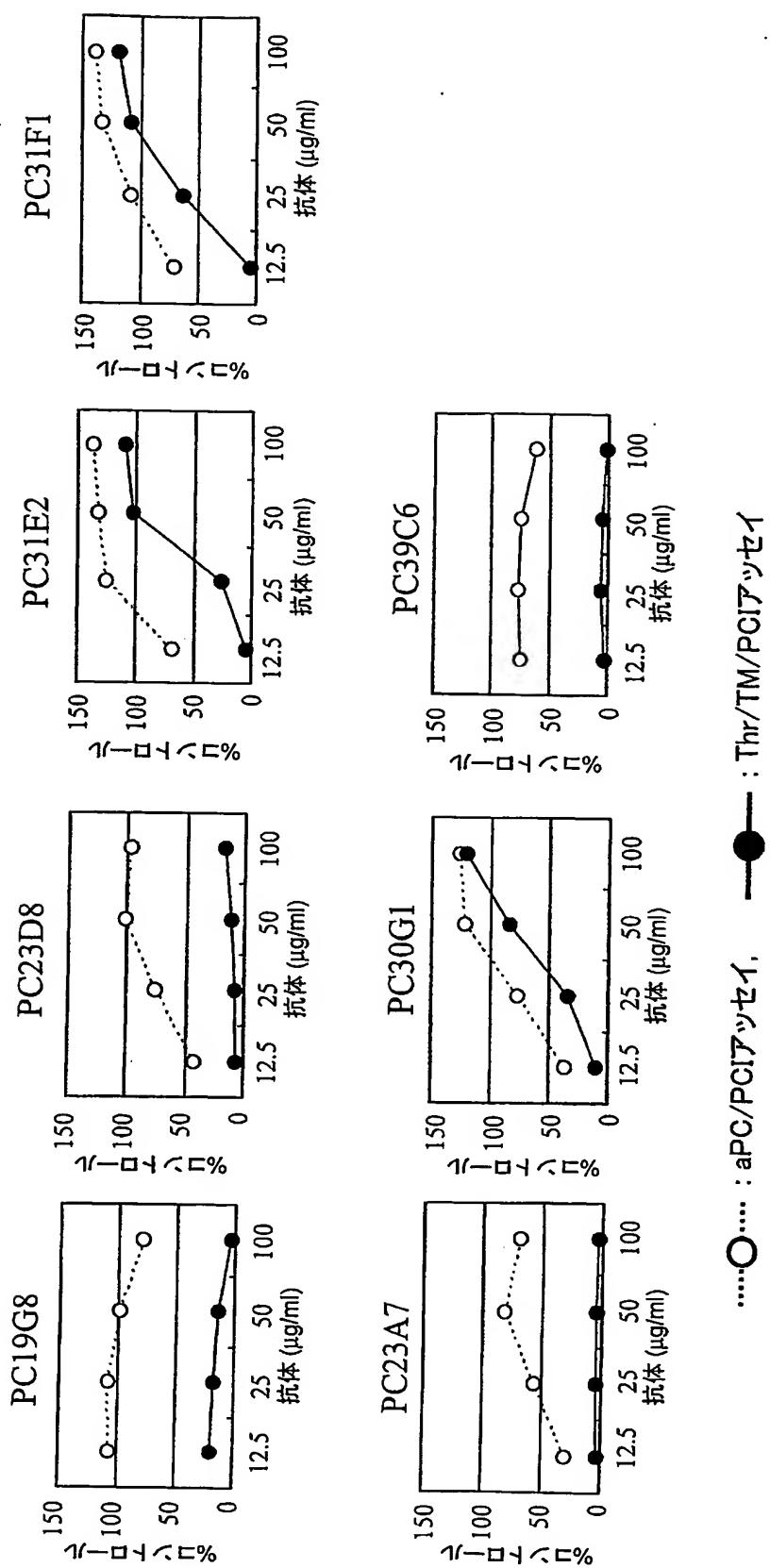


図 5

	CDR1	CDR2	CDR3
PC23D8	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGF DIK	DTFMH WVKQRP E QGLEWIG	GGYDVREFAY WGQGTLVTVSA
PC19G8	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGF DIK	DTFMH WVKQRP E QGLEWIG	GGYDVREFAY WGQGTLVTVSA
PC23A7	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGF DIK	DTFMH WVKQRP E QGLEWIG	GGYDVREFAY WGQGTLVTVSA
PC39C6	EVQLQQSGAELVKSLCKASGF NIK	DYYIH WVKQRP E QGLEWIG	GGYDVREFAY WGQGTLVTVSA
PC31F1	EVKLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF DFS	RYWMS WVRQAPGKGLEWIG	GGYDVREFAY WGQGTLVTVSA
PC30G1	EVKLESGGGLVQPGGSLKFSCCEASGF DFS	RYWMS WVRQAPGKGLEWIG	GGYDVREFAY WGQGTLVTVSA
PC31E2	QVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKA FG YTFT	TYP IE WMKQNHGKSLEWIG	GGYDVPSFAY WGQGTLVTVSA
PC23D8	KATTGDTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCAR	KATTGDTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCAR	WGQGTTLVSSA (配列番号 : 8)
PC19G8	KATTGDTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCAR	RATTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCAR	WGQGTTLVSSA (配列番号 : 9)
PC23A7	RATTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCAR	KDNITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCAR	WGQGTTLVSSA (配列番号 : 10)
PC39C6	KDNITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCAR	KFISRDNAKKTLYLQM NKVRS EDTAL Y YCAR	WGQGTTLVSSA (配列番号 : 11)
PC31F1	KFISRDNAKKTLYLQM NKVRS EDTAL Y YCAR	FFYYGTPDY	WGQGTTLVSSA (配列番号 : 12)
PC30G1	RFISRDNAKNTVY LQM SKVRS EDTAL Y YCAR	LFYYGTPDY	WGQGTTLVSSA (配列番号 : 13)
PC31E2	KAKLTVEKSSSTVYLELSRLTSDDSAVY YCAR	GHDYDYGMDY	WGQGTSVTVSSA (配列番号 : 14)

図 6

CDR1		CDR2		CDR3	
PC23D8	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITC	SATSSLIYMH	WFQQKPGSSPELWIY	RSSYPFT	FGSGTKLEIK
PC19G8	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITC	SATSSLIYMH	WFQQKPGSSPELWIY	RSSYPFT	FGSGTKLEIK
PC23A7	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITC	SATSSLIYMH	WFQQKPGTSPKLWIY	RSSYPFT	FGSGTKLEIK
PC39C6	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITC	SASSSVSYMH	WFQQKPGTSPKLWIY	RSSYPFT	FGSGTKLEIK
PC31F1	DIVMTQSHKFMSASVGDRVSITC	KASQDVIVAVA	WYQQKPGQSPPELLIY	RSSYPFT	FGGGTKLEIK
PC30G1	DIVMTQSHKFMSASVGDRVSITC	KASQDVIVAVA	WYQQKPGQSPKLLIY	RSSYPFT	FGGGTKLEIK
PC31E2	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	KASQSVYDGDSYLN	WYQQKPGQPPKLLIY	RSSYPFT	SNEDPPT
PC23D8	RFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ				
PC19G8	RFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ				
PC23A7	RFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ				
PC39C6	RFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ				
PC31F1	RFTGSGSGTIDFTFTTISSVQAEDLAVYYCQQ				
PC30G1	RFSGSGSGTIDFTFTTISSVQAEDLAVYYCQQ				
PC31E2	RFSGSGSGTIDFTLDIHPVEEEADAATYYCQQ				

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Anti-PCI neutralizing antibodies

<130> C1-A0226P

<150> JP 2003-011529

<151> 2003-01-20

<160> 60

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized sequence

<400> 1

acgaattcca ccatgcagct cttcctc

17

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized sequence

<400> 2

ctggatcctc agggcgggtt cactttgc

18

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized sequence

<400> 3

ttggatccgg ggttcacttt gccaaag

16

<210> 4

<211> 1237

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized sequence encoding human PCI

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1228)

<400> 4

gaattccacc atg cag ctc ttc ctc ctc ttg tgc ctg gtg ctt ctc agc 49
Met Gln Leu Phe Leu Leu Cys Leu Val Leu Leu Ser
1 5 10

cct cag ggg gcc tcc ctt cac cgc cac cac ccc cgg gag atg aag aag 97
Pro Gln Gly Ala Ser Leu His Arg His His Pro Arg Glu Met Lys Lys
15 20 25

aga gtc gag gac ctc cat gta ggt gcc acg gtg gcc ccc agc agc aga 145
Arg Val Glu Asp Leu His Val Gly Ala Thr Val Ala Pro Ser Ser Arg
30 35 40 45

agg gac ttt acc ttc gac ctc tac agg gtc ttg gct tcc gct gcc ccc 193
Arg Asp Phe Thr Phe Asp Leu Tyr Arg Val Leu Ala Ser Ala Ala Pro
50 55 60

agc cag aat atc ttc ttc tcc cct gtg agc atc tcc atg agc ctg gcc 241
Ser Gln Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ser Met Ser Leu Ala
65 70 75

atg ctc tcc ctg ggg gct ggg tcc agc aca aag atg cag atc ctg gag 289
Met Leu Ser Leu Gly Ala Gly Ser Ser Thr Lys Met Gln Ile Leu Glu
80 85 90

ggc ctg ggc ctc aac ctc cag aaa agc tca gag gag gag ctg cac aga 337
Gly Leu Gly Leu Asn Leu Gln Lys Ser Ser Glu Glu Glu Leu His Arg
95 100 105

ggc ttt cag cag ctc ctt cag gaa ctc aac cag ccc aga gat ggc ttc 385
Gly Phe Gln Gln Leu Leu Gln Glu Leu Asn Gln Pro Arg Asp Gly Phe
110 115 120 125

cag ctg agc ctc ggc aat gcc ctt ttc acc gac ctg gtg gta gac ctg 433
Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Val Asp Leu
130 135 140

cag gac acc ttc gta agt gcc atg aag acg ctg tac ctg gca gac act 481
Gln Asp Thr Phe Val Ser Ala Met Lys Thr Leu Tyr Leu Ala Asp Thr
145 150 155

ttc ccc acc aac ttt agg gac tct gca ggg gcc atg aag cag atc aat 529
Phe Pro Thr Asn Phe Arg Asp Ser Ala Gly Ala Met Lys Gln Ile Asn
160 165 170

gat tat gtg gca aag caa acg aag ggc aag att gtg gac ttg ctt aag 577
Asp Tyr Val Ala Lys Gln Thr Lys Gly Lys Ile Val Asp Leu Leu Lys
175 180 185

aac ctc gat agc aat gcg gtc gtg atc atg gtg aat tac atc ttc ttt 625
Asn Leu Asp Ser Asn Ala Val Val Ile Met Val Asn Tyr Ile Phe Phe
190 195 200 205

aaa gct aag tgg gag aca agc ttc aac cac aaa ggc acc caa gag caa 673
Lys Ala Lys Trp Glu Thr Ser Phe Asn His Lys Gly Thr Gln Glu Gln
210 215 220

gac ttc tac gtg acc tcg gag act gtg gtg cgg gta ccc atg atg agc 721
Asp Phe Tyr Val Thr Ser Glu Thr Val Val Arg Val Pro Met Met Ser
225 230 235

cgc gag gat cag tat cac tac ctc ctg gac cgg aac ctc tcc tgc agg 769
Arg Glu Asp Gln Tyr His Tyr Leu Leu Asp Arg Asn Leu Ser Cys Arg
240 245 250

gtg gtg ggg gtc ccc tac caa ggc aat gcc acg gct ttg ttc att ctc 817
Val Val Gly Val Pro Tyr Gln Gly Asn Ala Thr Ala Leu Phe Ile Leu
255 260 265

ccc agt gag gga aag atg cag cag gtg gag aat gga ctg agt gag aaa 865
Pro Ser Glu Gly Lys Met Gln Gln Val Glu Asn Gly Leu Ser Glu Lys
270 275 280 285

acg ctg agg aag tgg ctt aag atg ttc aaa aag agg cag ctc gag ctt 913
Thr Leu Arg Lys Trp Leu Lys Met Phe Lys Lys Arg Gln Leu Glu Leu
290 295 300

tac ctt ccc aaa ttc tcc att gag ggc tcc tat cag ctg gag aaa gtc 961
Tyr Leu Pro Lys Phe Ser Ile Glu Gly Ser Tyr Gln Leu Glu Lys Val
305 310 315

ctc ccc agt ctg ggg atc agt aac gtc ttc acc tcc cat gct gat ctg 1009
Leu Pro Ser Leu Gly Ile Ser Asn Val Phe Thr Ser His Ala Asp Leu
320 325 330

tcc ggc atc agc aac cac tca aat atc cag gtg tct gag atg gtg cac 1057
Ser Gly Ile Ser Asn His Ser Asn Ile Gln Val Ser Glu Met Val His
335 340 345

aaa gct gtg gtg gag gtg gac gag tcg gga acc aga gca gcg gca gcc 1105
Lys Ala Val Val Glu Val Asp Glu Ser Gly Thr Arg Ala Ala Ala Ala
350 355 360 365

acg ggg aca ata ttc act ttc agg tcg gcc cgc ctg aac tct cag agg 1153
Thr Gly Thr Ile Phe Thr Phe Arg Ser Ala Arg Leu Asn Ser Gln Arg
370 375 380

cta gtg ttc aac agg ccc ttt ctg atg ttc att gtg gat aac aac atc 1201
Leu Val Phe Asn Arg Pro Phe Leu Met Phe Ile Val Asp Asn Asn Ile
385 390 395

ctc ttc ctt ggc aaa gtg aac cgc ccc tgaggatcc 1237
Leu Phe Leu Gly Lys Val Asn Arg Pro
400 405

<210> 5
<211> 406
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Human PCI

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(19)

<400> 5
Met Gln Leu Phe Leu Leu Cys Leu Val Leu Leu Ser Pro Gln Gly

1

5

10

15

Ala Ser Leu His Arg His His Pro Arg Glu Met Lys Lys Arg Val Glu
20 25 30

Asp Leu His Val Gly Ala Thr Val Ala Pro Ser Ser Arg Arg Asp Phe
35 40 45

Thr Phe Asp Leu Tyr Arg Val Leu Ala Ser Ala Ala Pro Ser Gln Asn
50 55 60

Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ser Met Ser Leu Ala Met Leu Ser
65 70 75 80

Leu Gly Ala Gly Ser Ser Thr Lys Met Gln Ile Leu Glu Gly Leu Gly
85 90 95

Leu Asn Leu Gln Lys Ser Ser Glu Glu Glu Leu His Arg Gly Phe Gln
100 105 110

Gln Leu Leu Gln Glu Leu Asn Gln Pro Arg Asp Gly Phe Gln Leu Ser
115 120 125

Leu Gly Asn Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Val Asp Leu Gln Asp Thr
130 135 140

Phe Val Ser Ala Met Lys Thr Leu Tyr Leu Ala Asp Thr Phe Pro Thr
145 150 155 160

Asn Phe Arg Asp Ser Ala Gly Ala Met Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val
165 170 175

Ala Lys Gln Thr Lys Gly Lys Ile Val Asp Leu Leu Lys Asn Leu Asp
180 185 190

Ser Asn Ala Val Val Ile Met Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Lys

195

200

205

Trp Glu Thr Ser Phe Asn His Lys Gly Thr Gln Glu Gln Asp Phe Tyr
210 215 220

Val Thr Ser Glu Thr Val Val Arg Val Pro Met Met Ser Arg Glu Asp
225 230 235 240

Gln Tyr His Tyr Leu Leu Asp Arg Asn Leu Ser Cys Arg Val Val Gly
245 250 255

Val Pro Tyr Gln Gly Asn Ala Thr Ala Leu Phe Ile Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Gly Lys Met Gln Gln Val Glu Asn Gly Leu Ser Glu Lys Thr Leu Arg
275 280 285

Lys Trp Leu Lys Met Phe Lys Lys Arg Gln Leu Glu Leu Tyr Leu Pro
290 295 300

Lys Phe Ser Ile Glu Gly Ser Tyr Gln Leu Glu Lys Val Leu Pro Ser
305 310 315 320

Leu Gly Ile Ser Asn Val Phe Thr Ser His Ala Asp Leu Ser Gly Ile
325 330 335

Ser Asn His Ser Asn Ile Gln Val Ser Glu Met Val His Lys Ala Val
340 345 350

Val Glu Val Asp Glu Ser Gly Thr Arg Ala Ala Ala Ala Thr Gly Thr
355 360 365

Ile Phe Thr Phe Arg Ser Ala Arg Leu Asn Ser Gln Arg Leu Val Phe
370 375 380

Asn Arg Pro Phe Leu Met Phe Ile Val Asp Asn Asn Ile Leu Phe Leu

385

390

395

400

Gly Lys Val Asn Arg Pro

405

<210> 6

<211> 1261

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized DNA encoding human PCI with Flag-tag

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1258)

<400> 6

gaattccacc	atg	cag	ctc	ttc	ctc	ctc	ttg	tgc	ctg	gtg	ctt	ctc	agc	49
Met	Gln	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Val	Leu	Leu	Ser		
1				5						10				

cct	cag	ggg	gcc	tcc	ctt	cac	cgc	cac	cac	ccc	cgg	gag	atg	aag	aag	97
Pro	Gln	Gly	Ala	Ser	Leu	His	Arg	His	His	Pro	Arg	Glu	Met	Lys	Lys	
15				20						25						

aga	gtc	gag	gac	ctc	cat	gta	ggt	gcc	acg	gtg	gcc	ccc	agc	agc	aga	145
Arg	Val	Glu	Asp	Leu	His	Val	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Pro	Ser	Ser	Arg	
30				35					40				45			

agg	gac	ttt	acc	ttc	gac	ctc	tac	agg	gtc	ttg	gct	tcc	gct	gcc	ccc	193
Arg	Asp	Phe	Thr	Phe	Asp	Leu	Tyr	Arg	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	
50				55						60						

agc	cag	aat	atc	ttc	ttc	tcc	cct	gtg	agc	atc	tcc	atg	agc	ctg	gcc	241
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Ser Gln Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ser Met Ser Leu Ala
65 70 75

atg ctc tcc ctg ggg gct ggg tcc agc aca aag atg cag atc ctg gag 289
Met Leu Ser Leu Gly Ala Gly Ser Ser Thr Lys Met Gln Ile Leu Glu
80 85 90

ggc ctg ggc ctc aac ctc cag aaa agc tca gag gag gag ctg cac aga 337
Gly Leu Gly Leu Asn Leu Gln Lys Ser Ser Glu Glu Glu Leu His Arg
95 100 105

ggc ttt cag cag ctc ctt cag gaa ctc aac cag ccc aga gat ggc ttc 385
Gly Phe Gln Gln Leu Leu Gln Glu Leu Asn Gln Pro Arg Asp Gly Phe
110 115 120 125

cag ctg agc ctc ggc aat gcc ctt ttc acc gac ctg gtg gta gac ctg 433
Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Val Asp Leu
130 135 140

cag gac acc ttc gta agt gcc atg aag acg ctg tac ctg gca gac act 481
Gln Asp Thr Phe Val Ser Ala Met Lys Thr Leu Tyr Leu Ala Asp Thr
145 150 155

ttc ccc acc aac ttt agg gac tct gca ggg gcc atg aag cag atc aat 529
Phe Pro Thr Asn Phe Arg Asp Ser Ala Gly Ala Met Lys Gln Ile Asn
160 165 170

gat tat gtg gca aag caa acg aag ggc aag att gtg gac ttg ctt aag 577
Asp Tyr Val Ala Lys Gln Thr Lys Gly Lys Ile Val Asp Leu Leu Lys
175 180 185

aac ctc gat agc aat gcg gtc gtg atc atg gtg aat tac atc ttc ttt 625
Asn Leu Asp Ser Asn Ala Val Val Ile Met Val Asn Tyr Ile Phe Phe
190 195 200 205

aaa gct aag tgg gag aca agc ttc aac cac aaa ggc acc caa gag caa 673

Lys Ala Lys Trp Glu Thr Ser Phe Asn His Lys Gly Thr Gln Glu Gln
210 215 220

gac ttc tac gtg acc tcg gag act gtg gtg cgg gta ccc atg atg agc 721
Asp Phe Tyr Val Thr Ser Glu Thr Val Val Arg Val Pro Met Met Ser
225 230 235

cgc gag gat cag tat cac tac ctc ctg gac cgg aac ctc tcc tgc agg 769
Arg Glu Asp Gln Tyr His Tyr Leu Leu Asp Arg Asn Leu Ser Cys Arg
240 245 250

gtg gtg egg gtc ccc tac caa ggc aat gcc acg gct ttg ttc att ctc 817
Val Val Gly Val Pro Tyr Gln Gly Asn Ala Thr Ala Leu Phe Ile Leu
255 260 265

ccc agt gag gga aag atg cag cag gtg gag aat gga ctg agt gag aaa 865
Pro Ser Glu Gly Lys Met Gln Gln Val Glu Asn Gly Leu Ser Glu Lys
270 275 280 285

acg ctg agg aag tgg ctt aag atg ttc aaa aag agg cag ctc gag ctt 913
Thr Leu Arg Lys Trp Leu Lys Met Phe Lys Lys Arg Gln Leu Glu Leu
290 295 300

tac ctt ccc aaa ttc tcc att gag ggc tcc tat cag ctg gag aaa gtc 961
Tyr Leu Pro Lys Phe Ser Ile Glu Gly Ser Tyr Gln Leu Glu Lys Val
305 310 315

ctc ccc agt ctg egg atc agt aac gtc ttc acc tcc cat gct gat ctg 1009
Leu Pro Ser Leu Gly Ile Ser Asn Val Phe Thr Ser His Ala Asp Leu
320 325 330

tcc ggc atc agc aac cac tca aat atc cag gtg tct gag atg gtg cac 1057
Ser Gly Ile Ser Asn His Ser Asn Ile Gln Val Ser Glu Met Val His
335 340 345

aaa gct gtg gtg gag gtg gac gag tcg gga acc aga gca gcg gca gcc 1105

Lys Ala Val Val Glu Val Asp Glu Ser Gly Thr Arg Ala Ala Ala Ala
350 355 360 365

acg ggg aca ata ttc act ttc agg tcg gcc cgc ctg aac tct cag agg 1153
Thr Gly Thr Ile Phe Thr Phe Arg Ser Ala Arg Leu Asn Ser Gln Arg
370 375 380

cta gtg ttc aac agg ccc ttt ctg atg ttc att gtg gat aac aac atc 1201
Leu Val Phe Asn Arg Pro Phe Leu Met Phe Ile Val Asp Asn Asn Ile
385 390 395

ctc ttc ctt ggc aaa gtg aac cgc ccc gga tcc gac tac aag gac gac 1249
Leu Phe Leu Gly Lys Val Asn Arg Pro Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp
400 405 410

gat gac aag tga 1261
Asp Asp Lys
415

<210> 7

<211> 416

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Human PCI with Flag-tag

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 7

Met Gln Leu Phe Leu Leu Cys Leu Val Leu Leu Ser Pro Gln Gly

1

5

10

15

Ala Ser Leu His Arg His His Pro Arg Glu Met Lys Lys Arg Val Glu
20 25 30

Asp Leu His Val Gly Ala Thr Val Ala Pro Ser Ser Arg Arg Asp Phe
35 40 45

Thr Phe Asp Leu Tyr Arg Val Leu Ala Ser Ala Ala Pro Ser Gln Asn
50 55 60

Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ser Met Ser Leu Ala Met Leu Ser
65 70 75 80

Leu Gly Ala Gly Ser Ser Thr Lys Met Gln Ile Leu Glu Gly Leu Gly
85 90 95

Leu Asn Leu Gln Lys Ser Ser Glu Glu Glu Leu His Arg Gly Phe Gln
100 105 110

Gln Leu Leu Gln Glu Leu Asn Gln Pro Arg Asp Gly Phe Gln Leu Ser
115 120 125

Leu Gly Asn Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Val Asp Leu Gln Asp Thr
130 135 140

Phe Val Ser Ala Met Lys Thr Leu Tyr Leu Ala Asp Thr Phe Pro Thr
145 150 155 160

Asn Phe Arg Asp Ser Ala Gly Ala Met Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val
165 170 175

Ala Lys Gln Thr Lys Gly Lys Ile Val Asp Leu Leu Lys Asn Leu Asp
180 185 190

Ser Asn Ala Val Val Ile Met Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Lys
195 200 205

Trp Glu Thr Ser Phe Asn His Lys Gly Thr Gln Glu Gln Asp Phe Tyr
210 215 220

Val Thr Ser Glu Thr Val Val Arg Val Pro Met Met Ser Arg Glu Asp
225 230 235 240

Gln Tyr His Tyr Leu Leu Asp Arg Asn Leu Ser Cys Arg Val Val Gly
245 250 255

Val Pro Tyr Gln Gly Asn Ala Thr Ala Leu Phe Ile Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Gly Lys Met Gln Gln Val Glu Asn Gly Leu Ser Glu Lys Thr Leu Arg
275 280 285

Lys Trp Leu Lys Met Phe Lys Lys Arg Gln Leu Glu Leu Tyr Leu Pro
290 295 300

Lys Phe Ser Ile Glu Gly Ser Tyr Gln Leu Glu Lys Val Leu Pro Ser
305 310 315 320

Leu Gly Ile Ser Asn Val Phe Thr Ser His Ala Asp Leu Ser Gly Ile
325 330 335

Ser Asn His Ser Asn Ile Gln Val Ser Glu Met Val His Lys Ala Val
340 345 350

Val Glu Val Asp Glu Ser Gly Thr Arg Ala Ala Ala Ala Thr Gly Thr
355 360 365

Ile Phe Thr Phe Arg Ser Ala Arg Leu Asn Ser Gln Arg Leu Val Phe
370 375 380

Asn Arg Pro Phe Leu Met Phe Ile Val Asp Asn Asn Ile Leu Phe Leu
385 390 395 400

Gly Lys Val Asn Arg Pro Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
405 410 415

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Phe Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Tyr Val Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Gly Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Val Arg Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 9

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Phe Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Tyr Val Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Gly Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Val Arg Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Ile Arg Asp Thr
20 25 30

Phe Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Leu Val Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Asn Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Val Arg Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Leu Glu Lys Gly Asn Ile Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Asp Asn Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Val Pro Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50

55

60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Phe Tyr Tyr Gly Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Phe Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Thr Tyr Thr Ser Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Phe Tyr Tyr Gly Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Pro Ile Glu Trp Met Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Lys Phe His Pro Asp Asn Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly His Asp Tyr Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 15

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ile Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Glu Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ile Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Glu Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ile Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65

70

75

80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Val Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 20

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Lys Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21

<211> 111

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 21

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Thr Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asp Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
100 105 110

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Asp Thr Phe Met His

1

5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Asp Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Arg Tyr Trp Met Ser

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Thr Tyr Pro Ile Glu

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Arg Ile Asp Tyr Val Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 27

Arg Ile Asp Leu Val Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Asn Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 28

Arg Ile Asp Leu Glu Lys Gly Asn Ile Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 29

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 30

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Thr Tyr Thr Ser Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 31

Lys Phe His Pro Asp Asn Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 32

Gly Gly Tyr Asp Val Arg Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 33

Gly Gly Tyr Asp Val Pro Ser Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 34

Phe Phe Tyr Tyr Gly Thr Pro Asp Tyr
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 35

Leu Phe Tyr Tyr Gly Thr Pro Asp Tyr
1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 36

Gly His Asp Tyr Asp Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 37

Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ile Tyr Met His
1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 38

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 39

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Val Ala Val Ala

1

5

10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 40

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Lys Ala Val Ala

1

5

10

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 41

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn

1

5

10

15

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 42

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala

1

5

10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp

1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Thr Pro Ala

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 47
His Tyr Ser Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 48
Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> *Artificial*

<220>
<223> *Heavy chain CDR1*

<220>
<221> *misc_feature*
<222> (2)..(2)
<223> "Xaa" in position 2 represents "Thr" or "Tyr"

<220>
<221> *misc_feature*

<222> (3)..(3)

<223> "Xaa" in position 3 represents "Phe" or "Tyr"

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> "Xaa" in position 4 represents "Met" or "Ile"

<400> 49

Asp Xaa Xaa Xaa His

1

5

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR2

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> "Xaa" in position 4 represents "Tyr" or "Leu"

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> "Xaa" in position 5 represents "Val" or "Glu"

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> "Xaa" in position 6 represents "Asn" or "Lys"

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> "Xaa" in position 7 represents "Gly" or "Val"

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> "Xaa" in position 9 represents "Thr" or "Ile"

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> "Xaa" in position 10 represents "Lys" or "Ile"

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> "Xaa" in position 14 represents "Lys" or "Asn"

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> "Xaa" in position 17 represents "Gly" or "Asp"

<400> 50

Arg Ile Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Asp Pro Xaa Phe Gln
1 5 10 15

Xaa

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR3

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> "Xaa" in position 6 represents "Arg" or "Pro"

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> "Xaa" in position 7 represents "Glu" or "Ser"

<400> 51

Gly Gly Tyr Asp Val Xaa Xaa Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR1

<400> 52

Arg Tyr Trp Met Ser

1

5

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR2

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> "Xaa" in position 10 represents "Asn" or "Thr"

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> "Xaa" in position 13 represents "Pro" or "Ser"

<400> 53

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Xaa Tyr Thr Xaa Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Heavy chain CDR3

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> "Xaa" in position 1 represents "Phe" or "Leu"

<400> 54

Xaa Phe Tyr Tyr Gly Thr Pro Asp Tyr

1

5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain CDR1

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> "Xaa" in position 3 represents "Thr" or "Ser"

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> "Xaa" in position 6 represents "Leu" or "Val"

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> "Xaa" in position 7 represents "Ile" or "Ser"

<400> 55

Ser Ala Xaa Ser Ser Xaa Xaa Tyr Met His

1

5

10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain CDR2

<400> 56

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala

1

5

10

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain CDR3

<400> 57

Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

1

5

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain CDR1

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> "Xaa" in position 8 represents "Val" or "Lys"

<400> 58

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Xaa Ala Val Ala

1

5

10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain CDR2

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> "Xaa" in position 2 represents "Ala" or "Thr"

<400> 59

Ser Xaa Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp

1

5

10

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Light chain CDR3

<400> 60

His Tyr Ser Ser Pro Pro Trp Thr

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C07K16/18, C12N15/13, C12P21/08, A61K39/395, A61P7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C07K16/18, C12N15/13, C12P21/08, A61K39/395, A61P7/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), SwissProt/PIR/
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/47626 A1 (Protease Ab, Swed), 17 August, 2000 (17.08.00), & EP 1151013 A1	1-10,13,14
Y	JP 11-124399 A (Eisai Co., Ltd.), 11 May, 1999 (11.05.99), (Family: none)	1-10,13,14
Y	WARE , J. et al., Localization of a factor VIII-inhibiting antibody epitope to a region between residues 338 and 362 of factor VIII heavy chain., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 1988, Vol.85, pages 3165 to 3169	1-10,13,14
Y	EP 1222929 A2 (COLLEN RES FOUND VZW D), 17 July, 2002 (17.07.02), & US 2003/0175268 A1	1-10,13,14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 08 March, 2004 (08.03.04)	Date of mailing of the international search report 30 March, 2004 (30.03.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000429

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000429

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 11, 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in Claims 11, 12 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl' C07K16/18, C12N15/13, C12P21/08, A61K39/395, A61P7/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl' C07K16/18, C12N15/13, C12P21/08, A61K39/395, A61P7/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), WPIDS(STN)
 SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 00/47626 A1 (Protease Ab, Swed) 2000.08.17 & EP 1151013 A1	1-10, 13, 14
Y	JP 11-124399 A (エーザイ株式会社) 1999.05.11 (ファミリーなし)	1-10, 13, 14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.03.2004

国際調査報告の発送日

30.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)
 鈴木 恵理子

4N 3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WARE J. et al., Localization of a factor VIII-inhibiting antibody epitope to a region between residues 338 and 362 of factor VIII heavy chain., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1988, Vol. 85, p. 3165-3169	1-10, 13, 14
Y	EP 1222929 A2 (COLLEN RES FOUND VZW D) 2002.07.17 & US 2003/0175268 A1	1-10, 13, 14

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表
 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面
 コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 11, 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 11, 12 に記載された発明は、ヒトの身体の治療による処置方法又は診断方法に係るものであるから、PCT17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。